

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**El ciervo (*Cervus elaphus*) como reservorio de agentes
transmisibles implicados en el fallo reproductivo en rumiantes
domésticos y silvestres en "Los Quintos de Mora"**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José María San Miguel Ayanz

Directoras

Gema Álvarez García
Esther Collantes Fernández

Madrid

© José María San Miguel Ayanz, 2020

Universidad Complutense de Madrid

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



**El ciervo (*Cervus elaphus*) como reservorio de agentes
transmisibles implicados en fallo reproductivo en rumiantes
domésticos y silvestres en “Los Quintos de Mora”**

Tesis Doctoral

José María San Miguel Ayanz

Directoras:

Gema Álvarez García

Esther Collantes Fernández

Madrid, 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. José María San Miguel Ayanz, estudiante en el Programa de Doctorado Programa de Doctorado en Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada: El ciervo (*Cervus elaphus*) como reservorio de agentes transmisibles implicados en fallo reproductivo en rumiantes domésticos y silvestres en “Los Quintos de Mora”

y dirigida por: Gema Álvarez García y Esther Collantes Fernández

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 11 de julio de 2019

Fdo.: _____

Agradecimientos

A lo largo de los años invertidos en la elaboración de la presente tesis, nunca imagine que este sería el último apartado que redactaría. Es realmente difícil enumerar en un apartado tan corto a tantas personas que me han ayudado. Con el fin de no olvidarme de ninguna, me gustaría reconocer y dar las gracias a todas las personas e instituciones que, de una u otra forma, han ayudado o contribuido en el desarrollo de la misma.

Me gustaría comenzar el apartado de agradecimientos con dos personas que han contribuido de una forma especial para que esta Tesis Doctoral haya podido realizarse. En primer lugar, la persona de la que más he aprendido en diferentes aspectos de la vida y comportamiento del ciervo, Natividad Polo, Guarda Mayor de Los Quintos de Mora, estoy seguro de que habría disfrutado con la lectura de esta Tesis Doctoral. La segunda, Carmen López por su apoyo en la recolección y gestión de los datos a pie de campo.

A los Directores de Los Quintos de Mora durante los años de realización del trabajo de campo José Manuel Sebastián, Carlos Rodríguez y Ángel Moreno, por apoyar en todo momento la realización de estudios de campo en la finca y por facilitar al máximo, con los recursos disponibles, la recogida de muestras. A todo el personal y guardería de Los Quintos de Mora, liderados por José Polo, por su apoyo y ayuda en todo momento, independientemente de las horas intempestivas a las que hubiera que trabajar.

A todo el equipo de SALUVET y a mis directoras de tesis, por su ayuda en los trabajos de campo y en el procesado de las muestras, así como, por su ayuda incondicional en el ámbito académico y científico para el desarrollo de esta Tesis Doctoral. A mi amigo Flan, que ha puesto luz en el complicado mundo de la leptospirosis.

Y, por supuesto, a mi FAMILIA, a mis hermanos y a mis padres a los que dedico esta Tesis. Especialmente agradezco la ayuda incondicional de mi hermano Alfonso, sin la que, con toda seguridad, este trabajo no se hubiera realizado.

A todos los que he nombrado y a los que no, pero de los que no me olvido, muchas gracias.

Índice

Índice de Tablas	7
Índice de Figuras	8
Listado de Abreviaturas	9
Resumen/ Summary	12
Resumen	13
Summary	16
Antecedentes	18
2.1. Una única sanidad “One Health” y el papel de la fauna silvestre	19
2.2. La especie objeto de estudio: el ciervo (<i>Cervus elaphus</i> L.)	26
2.2.1. Introducción	26
2.2.2. Taxonomía	27
2.2.3. Distribución	27
2.2.4. Morfología	28
2.2.5. Hábitat	30
2.2.6. Reproducción	31
2.2.7. Alimentación	31
2.2.8. Etología	32
2.3. El sitio de ensayo: la finca “Los Quintos de Mora”, Los Yébenes, Toledo.	33
2.3.1. Estado legal	33
2.3.2. Historia	33
2.3.3. El ecosistema: ecología y funcionamiento	34
2.3.3.1. Geografía y orografía	34
2.3.3.2. Hidrografía	34
2.3.3.3. Clima	35
2.3.3.4. Geología, litología y suelos	35
2.3.3.5. Flora y vegetación	35
2.3.3.6. Fauna	36
2.3.4. Poblaciones de ungulados silvestres	37
2.3.4.1. Ciervo (<i>Cervus elaphus hispanicus</i>)	37
2.3.4.2. Jabalí (<i>Sus scrofa</i>)	41
2.3.4.3. Gamo (<i>Dama dama</i>) y corzo (<i>Capreolus capreolus</i>)	41

2.4. Agentes transmisibles implicados en fallo reproductivo en rumiantes domésticos y silvestres	42
2.4.1. Sanidad del ciervo en España	42
2.4.2. Enfermedades parasitarias.....	43
2.4.2.a. Neosporosis	43
2.4.2.a.1. Etiología	43
2.4.2.a.2. Ciclo biológico y transmisión	43
2.4.2.a.3. Situación actual en los rumiantes domésticos.....	45
2.4.2.a.4. Situación actual en ungulados silvestres	45
2.4.2.b. Toxoplasmosis.....	48
2.4.2.b.1. Etiología	48
2.4.2.b.2. Ciclo biológico y transmisión.....	48
2.4.2.b.3. Situación actual en los rumiantes domésticos	49
2.4.2.b.4. Situación actual en ungulados silvestres	50
2.4.3. Enfermedades bacterianas.....	51
2.4.3.a. Leptospirosis	51
2.4.3.a.1. Etiología	52
2.4.3.a.2. Transmisión.....	52
2.4.3.a.3. Situación actual en los rumiantes domésticos.....	53
2.4.3.a.4. Situación actual en ungulados silvestres	55
2.4.3.b. Fiebre Q	56
2.4.3.b.1. Etiología	57
2.4.3.b.2. Transmisión.....	57
2.4.3.b.3. Situación actual en los rumiantes domésticos	58
2.4.3.b.4. Situación actual en ungulados silvestres	59
2.4.3.c. Brucelosis	60
2.4.3.c.1. Etiología.....	60
2.4.3.c.2. Transmisión	61
2.4.3.c.3. Situación actual en los rumiantes domésticos	62
2.4.3.c.4. Situación actual en ungulados silvestres	63
2.4.4. Enfermedades víricas	64
2.4.4.a. Rinotraqueitis infecciosa bovina / Vulvovaginitis pustular infecciosa	64
2.4.4.a.1. Etiología	64
2.4.4.a.2. Transmisión.....	64

2.4.4.a.3. Situación actual en el ganado bovino	65
2.4.4.a.4. Situación actual en ungulados silvestres	66
2.4.4.b. Diarrea vírica bovina / Enfermedad de las mucosas.....	68
2.4.4.b.1. Etiología	68
2.4.4.b.2. Transmisión.....	69
2.4.4.b.3. Situación actual en los rumiantes domésticos	70
2.4.4.b.4. Situación actual en ungulados silvestres	71
2.4.4.c. Lengua azul y enfermedad de Schmallenberg.....	72
2.4.4.c.1. Lengua Azul	72
2.4.4.c.1.1. Etiología.....	73
2.4.4.c.1.2. Transmisión	73
2.4.4.c.1.3. Situación actual en rumiantes domésticos	74
2.4.4.c.1.4. Situación actual en ungulados silvestres	74
2.4.4.c.2. Enfermedad de Schmallenberg.....	76
2.4.4.c.2.1. Etiología.....	76
2.4.4.c.2.2. Transmisión	76
2.4.4.c.2.3. Situación en los rumiantes domésticos.....	77
2.4.4.c.2.4. Situación en ungulados silvestres	77
Justificación y objetivos.....	78
Resultados.....	82
4.1. Efecto de los diferentes ecosistemas y prácticas de gestión en las infecciones por <i>Toxoplasma gondii</i> y <i>Neospora caninum</i> en los rumiantes silvestres de España.....	83
4.2. Seroprevalencia de leptospirosis, brucelosis y fiebre Q en una población silvestre de ciervo (<i>Cervus elaphus</i>) sin contacto con el ganado doméstico.	93
4.3. La vigilancia epidemiológica de los principales patógenos bovinos de etiología vírica demuestra la circulación del virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), el herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) y la circulación del virus de la lengua azul (BTV) en una población cerrada de ciervo rojo (<i>Cervus elaphus</i>).....	102
Discusión	114
Conclusiones	120
Bibliografía.....	122
Anexos: Artículos científicos	162

Índice de Tablas

Tabla 1: Susceptibilidad a enfermedades relevantes de mamíferos terrestres y aves silvestres españoles (negro: susceptible; gris: desconocido; blanco: no susceptible) (MAPAMA, 2017a).....	25
Tabla 2: Agrupación de transectos para muestreo de la población de ciervos por tipo de hábitat	39
Tabla 3: Aislamientos y detección del ADN de <i>Nesopora caninum</i> en cérvidos	46
Tabla 4: Prevalencia de <i>N. caninum</i> en el gamo, el corzo y el ciervo rojo en Europa.....	47
Tabla 5: Prevalencia de <i>T. gondii</i> en rumiantes silvestres en Europa	50
Tabla 6: Prevalencia de <i>T. gondii</i> en rumiantes silvestres en España	51
Tabla 7: Características de la infección por serovariedades adaptadas y accidentales de <i>Leptospira</i> spp.	53
Tabla 8: Prevalencia de las serovariedades más importantes en ganado vacuno en España	54
Tabla 9: Alfaherpesvirus de rumiantes relacionados con el BoHV-1	67
Tabla 10: Seroprevalencias de alfaherpesvirus de rumiantes silvestres	68
Tabla 11: Especies y subtipos del género <i>Pestivirus</i>	69
Tabla 12: Transmisión interespecífica del BVDV	70
Tabla 13: Prevalencias de BVDV en el ganado bovino en España	71
Tabla 14: Prevalencias de BTV en ciervo rojo (<i>Cervus elaphus</i>) en España	75

Índice de Figuras

Figura 1: <i>Cervus elaphus hispanicus</i>. A: Vareto; B: Cierva con gabato	27
Figura 2: Adultos de ciervo. A: Grupo de hembras; B: Macho	28
Figura 3: Machos de ciervos con diferente grado de desarrollo de la cuerna. A: Imagen de un venado desmogado, un venado con cuerna y un horquillón junto a una cierva. B: Venado adulto con una cuerna de 14 puntas	29
Figura 4: Venados con velvet	30
Figura 5: Gestión de pastos en fincas cinegéticas. A: Pradera de regadío; B: Zona de siembra de cereal	32
Figura 6: Grupo familiar de ciervas	32
Figura 7: Finca Quintos de Mora. De izquierda a derecha: zona de umbría, raña y zona de solana	34
Figura 8: Distribución de los principales tipos de suelos y formaciones vegetales en la finca Los Quintos de Mora	36
Figura 9: Transectos empleados para estimar el censo de ciervos en Los Quintos de Mora.....	38
Figura 10: Estratificación de Los Quintos de Mora por topografía y vegetación, que ha sido empleada para la realización de los transectos orientados al muestreo de la población de ciervos	39
Figura 11: Evolución de la población de ciervos de Los Quintos de Mora estimada mediante muestreo por transectos	41
Figura 12: Situación de la brucelosis bovina en España (Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis Bovina 2018 MAPAMA)	62
Figura 13.: Situación de la brucelosis ovina y caprina en España (Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis ovina y caprina 2017-2018 MAPAMA)	63
Figura 14.: Situación de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Europa	66
Figure 15.: Serotipos de BTV en Europa en Noviembre de 2018.....	74

Listado de Abreviaturas

ACU: Asociación Conservación del Urogallo
ADN: Ácido Desoxirribonucleico
AECOSAN: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
AEMET: Agencia Estatal de Meteorología
APSW: Abortion, delivery of Premature offspring, Stillbirth and Weak offspring
ASOPROVAC: Asociación Productores Vacuno de Carne
AVMA: American Veterinary Medical Association
BDV: Virus de la Enfermedad de Border
BHV-1: Herpes Virus Bovino-1
BoHV: Herpes Virus Bovino
BTV: Virus de la Lengua Azul
BuHV-1: Herpes Virus Búfalo-1
BVD: Diarrea Vírica Bovina
BVDV: Virus de la Diarrea Vírica Bovina
CCAA: Comunidades Autónomas
CpHV-1: Herpes Virus Caprino-1
CSFV: Virus de la Peste Porcina Clásica
CvHV-1: Herpes Virus Ciervo-1
CvHV-2: Herpes Virus Ciervo-2
CSIC-UCLM: Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Castilla-La Mancha
EE.UU: Estados Unidos de América
EFSA: European Food Safety Authority
EIE: Enfermedades Infecciosas Emergentes
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ElkHV-1: Herpes Virus Wapiti-1
EMS: Sistema de Manejo de Eventos
ERB: Enfermedad Respiratoria Bovina
FITC: Fluorescein Isothiocyanate
FSC: Forest Stewardship Council

ha: Hectáreas

HCV: Hog Cholera Virus (Peste Porcina Clásica)

HSV: Herpes Virus Simple

IBR: Rinotraqueítis Infecciosa Bovina

IBR/IPV: Rinotraqueítis Infecciosa Bovina/Vulvovaginitis Pustular Infecciosa.

IFAT: Immunofluorescence Antibody Test

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

Ig G: Inmunoglobulina isotipo G

IHC: Inmunohistoquímica

Ind: individuos

IPI: Inmunotolerante Persistentemente Infectado

IREC: Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos

Km: Kilómetro

LSITM: Laboratoire Service International

m: metro

MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

MAPAMA: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación

MAT: Modified Agglutination Test

MD: Enfermedad de las Mucosas

NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases

OD: Densidad Óptica

OIE: Organización Internacional de Epizootias (Organización Mundial de Sanidad Animal en la actualidad)

ONEGEST: Evaluación de protocolos de bioseguridad y de la gestión de ungulados en la transmisión de enfermedades compartidas

ONG: Organización No Gubernamental

ONO-ESE: Oeste Noroeste-Este Sudeste.

OR: Odds Ratio

PAC: Política Agraria común

PATUBES: Plan de Actuación sobre Tuberculosis en Especies Silvestres

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PFE: Patrimonio Forestal del Estado

PI: Persistentemente Infectado

PIB: Producto Interior Bruto

PNVFS: Programa Nacional de Vigilancia en Fauna Silvestre

RAE: Real Academia Española

RASVE: Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria

RNA: Ácido ribonucleico

SBV: Virus de Schmallenberg

SEO: Sociedad Española de Ornitología

SNC: Sistema Nervioso Central

VZV: Varicela Zoster Virus

WHO/OMS: Organización Mundial de la Salud

CAPÍTULO I

Resumen/ Summary

Resumen

La tecnificación de la ganadería en las últimas décadas ha propiciado que se incrementen los problemas sanitarios, en particular los asociados a las enfermedades compartidas con la fauna silvestre y con el ser humano (zoonosis). Las enfermedades infecciosas emergentes son la principal causa de muerte en el mundo y, actualmente, la fauna silvestre es el origen de más del 70 % de estas enfermedades. Todo ello ha llevado a acuñar la iniciativa “Una única sanidad”, cuyo mensaje es que la sanidad humana está estrechamente relacionada con la sanidad animal y con el medio ambiente. Por tanto, es imprescindible adoptar estrategias de control de enfermedades transmisibles que engloben los tres pilares: el ser humano, la ganadería y la fauna silvestre y el medio ambiente. De todos ellos, el pilar menos conocido es la sanidad de la fauna silvestre y, en concreto, la de los ungulados, que son los que tienen una relación más directa e intensa con el ganado doméstico. En España, el aumento del censo del ganado doméstico en explotación extensiva y la intensificación de esta producción han generado un incremento de la densidad de animales alrededor de los puntos de suplementación de agua y alimento, facilitando la transmisión de enfermedades entre el ganado doméstico y la fauna silvestre. Por otra parte, la sobreabundancia de especies cinegéticas, fundamentalmente el jabalí y el ciervo, unida a la ausencia de medidas de vigilancia epidemiológica (activa y pasiva) de las enfermedades transmisibles, incluyendo las zoonosis, están planteando importantes problemas sanitarios.

Por su parte, hasta la fecha son escasos los estudios sobre enfermedades relevantes en la producción, distintas a las de declaración obligatoria (p. ej. la tuberculosis o la lengua azul), que repercuten en la reproducción y que son compartidas por los rumiantes domésticos y silvestres. Así mismo, se desconoce el efecto de la gestión de las poblaciones de ciervo sobre su situación sanitaria. Por ello, la presente tesis doctoral ha estudiado por primera vez los efectos de una gestión sostenible realizada en una finca de caza cerrada sobre la prevalencia de las infecciones causadas por los patógenos transmisibles y con impacto en la reproducción más relevantes en los rumiantes domésticos y que son compartidos con el ciervo y en muchos casos con el hombre.

La presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la prevalencia de las infecciones por agentes patógenos de etiología parasitaria (Objetivo 1), bacteriana (Objetivo 2) y vírica (Objetivo 3) que son agentes etiológicos de fallo reproductivo en los rumiantes, y algunos de ellos a su vez son zoonóticos. En los estudios se han empleado diferentes pruebas serológicas, moleculares e histológicas y se han llevado a cabo primordialmente en la finca “Los Quintos de Mora”, de Los Yébenes (Toledo), propiedad del Organismo Autónomo Parques Nacionales, vallada perimetralmente y sin presencia de ganado doméstico desde hace más de 50 años. En el caso del ciervo se realizaron dos muestreos con un intervalo de cinco años (2007 y 2012), con diferentes densidades poblacionales y medidas de gestión de pastos naturales y comederos en ambos muestreos, 37 reses/km² en 2007 y 25 reses/km² en 2012 y acceso a pastos naturales y comederos durante las épocas de escasez de alimentos.

Con respecto a las infecciones de etiología parasitaria, el estudio se centró en las infecciones causadas por los protozoos apicomplejos formadores de quistes *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*, cuya prevalencia fue estudiada en poblaciones de corzo

(*Capreolus capreolus*) y rebeco (*Rupicapra rupicapra*) de tres reservas de caza de la Cordillera Cantábrica (Riaño, Mampodre y Ancares) y de ciervo (*Cervus elaphus*) en “Los Quintos de Mora”. Los valores de seroprevalencia fueron bajos en todos los casos, independientemente de las especies y zonas geográficas estudiadas. En el caso de la infección por *T. gondii* las tasas de seroprevalencia fueron del 2% en el corzo y 4% en el rebeco. Por el contrario, el 13% de los ciervos analizados en 2007 fueron seropositivos, descendiendo significativamente el número de animales seropositivos al 2% en 2012. Este descenso puede ser debido a los nuevos sistemas de manejo instaurados, con el objetivo de reducir la densidad de ciervos y la de aportar una suplementación de alimento en las épocas de mayor escasez, invierno y verano mediante manejo de pastos naturales. Aun así, se pone de manifiesto la existencia de un ciclo silvático de *T. gondii* y un riesgo potencial para los humanos asociado al consumo de carne de ciervo. En el caso de *N. caninum* solo encontramos prevalencias del 1% en el ciervo en ambos muestreos, por tanto, el ciclo silvático no parece ser relevante, al contrario que el ciclo doméstico en el que los rumiantes domésticos juegan un papel primordial.

En el caso de los patógenos de etiología bacteriana, al igual que en los de etiología vírica, el estudio se centró en el ciervo y en la finca “Los Quintos de Mora”. Los resultados obtenidos indican que el ciervo, posiblemente, no sea un hospedador relevante de las especies lisas de *Brucella* spp. y *Coxiella burnetii* en esta área, ya que no se encontraron anticuerpos frente a ninguna de ellas en ninguna de las muestras analizadas. La seroprevalencia frente a *Leptospira* spp. en el primer muestreo fue del 9,4% para los serovares Canicola y Panama, mientras que cinco años después la seroprevalencia se incrementó hasta el 38,5%, y, únicamente, frente al serovar Pomona. No se detectó ADN de *Leptospira* en ninguna de las placetas y tejidos fetales procedentes de animales seropositivos y gestantes. Estos resultados indicarían que el ciervo es un hospedador accidental del serovar Pomona y se piensa que el jabalí podría ser el responsable de este incremento de la seroprevalencia.

El estudio de los agentes de etiología vírica se realizó en los años 2007 y 2012 en el caso del virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) y alfaherpesvirus relacionados con el herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) y, únicamente, en el año 2012 en el caso del virus de Schmallenberg (SBV) y el virus de la lengua azul (BTV). Las tasas de seroprevalencia frente a la infección por el virus BVDV descendieron drásticamente desde el 10% en 2007 hasta el 0% en 2012. Las seroprevalencias observadas frente a la infección por herpesvirus relacionados con el virus BoHV-1 apenas variaron entre ambos muestreos (21,6 % y 20,2 %), lo que hace pensar que la población de ciervos estudiada fue capaz de mantener la infección sin contacto previo con el ganado doméstico. No se detectaron lesiones compatibles con la infección por BoHV-1, como necrosis focales con infiltrado leucocitario, ni cuerpos de inclusión, en las placetas y tejidos fetales de las hembras gestantes seropositivas (n=16). Además, en este estudio no se detectaron animales seropositivos frente al SBV, posiblemente porque este estudio se realizó con anterioridad a la detección de los primeros casos de esta infección vírica en los rumiantes domésticos en España, tras el primer brote detectado en Europa en 2011-2012. Finalmente, a pesar del reducido número de animales seropositivos frente al BTV encontrado, los resultados han demostrado que el virus puede circular en la población de ciervos en ausencia del ganado doméstico. El ciclo silvático del BTV es clave en Europa y debe tenerse en cuenta en los planes de control y erradicación, en zonas donde la climatología permite la presencia de vectores durante una gran parte del año.

Por tanto, una gestión sostenible de las reservas de caza debe incluir el descenso de la densidad de animales (ciervos y otros reservorios como el jabalí) y una gestión adecuada de los pastos naturales para disminuir el riesgo de estrés por competencia y la transmisión de patógenos y así asegurar la sostenibilidad de los espacios naturales. Sin embargo, no se descarta la circulación del SBV y de otros serotipos del BTV en este tipo de reservas cinegéticas en un futuro, dada la naturaleza vectorial de estas infecciones y que son endémicas en nuestro país.

Summary

The livestock technification occurred during the last decades has led to an increase of health problems, particularly diseases shared by wildlife and humans (zoonoses). Emerging infectious diseases (EID) are the leading cause of death worldwide and, currently, wildlife is the source of more than 70% EID. The initiative "One Health" is based on the assumption that human health is closely related to animal health and the environment. Therefore, it is essential to adopt control strategies to combat transmissible diseases including the three pillars: humans, livestock and wildlife and environment. Health of wildlife and, in particular, ungulates, that share habitat with livestock and humans has been poorly investigated. The increase of the domestic cattle census raised under extensive management systems in Spain and the intensification of this productions have increased density of animals around water and feed supplementation points that favors the transmission of diseases between livestock and wildlife. On the other hand, the overabundance of game species, mainly wild boar and red deer, together with the absence of epidemiological surveillance (active and passive monitoring) of transmissible diseases including zoonoses, are posing relevant health threats.

Moreover, to date there are few studies carried out on relevant production diseases shared between domestic and wild ruminants other than those subjected to compulsory control programmes (eg. tuberculosis or bluetongue), which have an impact on reproduction. Likewise, the effect of sustainable management practices to control red deer populations on their health status is unknown. For this reason, this doctoral thesis has studied, for the first time, the effects of sustainable management measures carried out in a closed hunting reserve on the prevalence of infections caused by the most relevant transmissible pathogens with an impact on reproduction in domestic ruminants and that are shared with livestock and even humans.

The study focused on the prevalence of infections caused by parasites (Objective 1), bacteria (Objective 2) and viruses (Objective 3) that cause reproductive failure in ruminants and some of them with a zoonotic potential. Herein, we have employed different serological, molecular and histological techniques. The studies were essentially carried out on the hunting reserve "Los Quintos de Mora", located in Los Yébenes (Toledo) and owned by the National Parks Autonomous Organization. This reserve is fenced around the perimeter and domestic livestock has been not present for more than 50 years. In the case of the red deer, two samplings were carried out with an interval of five years and with different population densities and management practices: 37 deers / km² in 2007 and 25 deers / km² in 2012 with access to natural pastures and feeder areas during seasons with low natural resources.

First, the study focused on the infections caused by the apicomplexan cyst-forming coccidia *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, whose prevalence was studied in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*) of three hunting reserves located in Cantabrian mountain range (Riaño, Mampodre and Ancares) and red deer (*Cervus elaphus*) in "Los Quintos de Mora". Seroprevalence values were low in all cases, regardless the species and geographic zones studied. In the case of *T. gondii* infection, seroprevalence rates were 2% in the roe deer and 4% in the chamois. Conversely, 13% of the red deer

analyzed in 2007 were seropositive, decreasing significantly to 2% in 2012. In the case of *N. caninum*, we only found 1% seroprevalence in red deer in both sampling periods. The results suggest a low frequency of sylvatic life cycles in the hunting reserves studied, so that interconnection between sylvatic and domestic life cycles is unlikely to occur. Regardless, a sustainable exploitation of natural resources in wildlife reserves may help to reduce the prevalence of *T. gondii* infection.

In the case of bacterial and viral infections, the study focused on the red deer located in "Los Quintos de Mora" reserve. The results obtained indicate that the red deer is unlikely to be a relevant host for smooth *Brucella* spp. and *Coxiella burnetii* in this area, since no antibodies were found. The seroprevalence against *Leptospira* spp. in the first sampling was 9.4% for Canicola and Panama serovars, whereas five years later the seroprevalence increased up to 38.5%, against Pomona serovar. *Leptospira* DNA was not detected in any of the placenta and fetal tissues from seropositive pregnant animals. These results would indicate that the red deer is an accidental host for Pomona serovar and it is suspected that the wildboard could be responsible for the seroprevalence increase.

The study on viral infections was carried out in 2007 and 2012 in the case of the bovine viral diarrhea virus (BVD) and alphaherpesviruses related to BoHV-1, and in 2012 in the case of Schmallenberg (SBV) and bluetongue virus (BTV). Seroprevalence rates against BVD virus infection decreased drastically from 10% in 2007 to 0% in 2012. The seroprevalences observed against herpesvirus infection related to the BoHV-1 virus barely varied between the two sampling periods (21.6% and 20.2%). Our results suggest that the red deer was able to maintain the infection without prior contact with livestock. In this study, no seropositive animals were detected against SBV, possibly because this study was carried out prior to the detection of the first cases of this viral infection in domestic ruminants in Spain following the first outbreak detected in Europe in 2011-2012. Despite the small number of seropositive animals found against the BTV, the results have shown that the virus can circulate in the red deer population in the absence of livestock. Therefore, the sylvatic cycle of BTV is key in Europe and should be taken into account in the control and eradication plans in areas where the weather conditions allow vectors activity.

In summary, sustainable management measures in hunting reserves should include a decrease in animal density (red deer and wildboard, among others) and providing natural pastures in order to reduce stress associated competence for natural resources and diseases transmission to finally ensure natural spaces sustainability. However, SBV and BTV circulation could be increased in the nearby future due to their vectorial nature and taking into account that these diseases are endemic in our country.

CAPÍTULO II

Antecedentes

2.1. Una única sanidad “One Health” y el papel de la fauna silvestre

Los avances tecnológicos han provocado no sólo beneficios relevantes para la humanidad, sino que también han modificado notablemente su entorno. A lo largo de su historia destacan, en primer lugar, el descubrimiento del fuego hace más de 400.000 años que permitió mejorar la caza y la supervivencia del ser humano (Roebroeks et al. 2011) y, posteriormente, el inicio de la agricultura y la ganadería en el Neolítico, hace unos 7.000-8.000 años en España (Maroto 1998; Ferrer 2016), permitiendo incrementar notablemente la población humana y que introdujo cambios en las especies de ungulados. Sin embargo, el cambio más significativo tuvo lugar hace unos 200 años, con la revolución industrial. Durante este corto periodo de tiempo los avances tecnológicos han provocado el denominado “Cambio Global”, caracterizado por el incremento exponencial de la población humana, llegando a superar los 7.500.000.000 de personas junto con sus necesidades alimenticias, lo que implica un mayor consumo de los recursos naturales. Todo ello está provocando una cascada de efectos de enorme trascendencia que, además, están relacionados entre sí, como el aumento de la superficie cultivable con la consiguiente deforestación, la pérdida acelerada de la biodiversidad (Ceballos et al. 2015), el incremento en la emisión de gases de efecto invernadero, que provoca el cambio climático de origen antrópico (Stocker 2014), la escasez y pérdida de la calidad del agua y una mayor desigualdad con tasas elevadas de pobreza.

Es evidente que la actividad humana ha transformado en muy poco tiempo la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas, los paisajes, el clima e, incluso, su propia población. Además, la facilidad de movimiento de personas y recursos entre los diferentes continentes ha facilitado la transmisión de enfermedades (Daszak et al. 2000; Alexander et al. 2002; Lehmann et al. 2006; Smith et al. 2007) y que las especies exóticas invasoras se conviertan en uno de los principales peligros para la biodiversidad mundial (Clavero y García-Berthou 2005; Pimentel et al. 2005).

Por otra parte, la ganadería se ha tecnificado de una forma muy sustancial en las últimas décadas, aumentando el número de cabezas y sus producciones. Esta expansión de la ganadería, a su vez, ha provocado que se incrementen los problemas sanitarios y, en particular, aquellos relacionados con las enfermedades compartidas con la fauna silvestre (epizootias) y con el ser humano (zoonosis). Las vías de contagio, mediante el contacto directo e indirecto (a través de suelo, agua, vectores y hospedadores intermediarios) se han incrementado hasta niveles históricos máximos (Bengis et al. 2002; Kock 2005; Barasona 2015). Las enfermedades infecciosas emergentes (EIE) o reemergentes están consideradas como un grave problema de salud pública y son la principal causa de muerte en todo el mundo. Además, el 60,3 % de todas las EIE son zoonosis (McDaniel et al. 2014) y, actualmente, la fauna silvestre es la fuente de más del 70% de todas las enfermedades emergentes (MAPAMA 2017a).

En las últimas décadas se ha producido un aumento muy significativo de la incidencia de las enfermedades transmisibles en la ganadería (Barasona 2015). Además, han aparecido nuevas enfermedades (Castillo et al. 2011), muchas de ellas compartidas entre el ganado doméstico y la fauna silvestre, e incluso con el ser humano (zoonosis). Se ha afirmado que el 56 % de la EIEs son zoonosis asociadas al ganado bovino (NIAID 2011). Viurchow acuñó el término zoonosis en el S XIX, y afirmaba que “ni existen, ni deberían existir líneas divisorias entre la medicina humana y animal”, lo que constituye

probablemente el primer germen de lo que hoy denominamos “One Health Initiative” (“Una Única Sanidad”), pero con casi dos siglos de antelación. Muchos ejemplos de enfermedades transmisibles zoonóticas (p.ej. tuberculosis, brucelosis, gripe aviar, diversas infecciones por rickettsias, encefalopatía espongiforme bovina, leishmaniosis y toxoplasmosis, entre otras) han saltado a los medios de comunicación, han disparado muchas alarmas en el mundo de la investigación y van haciendo cobrar conciencia de la gravedad del problema que, como dijimos, debe ser atajado de una forma global: que afecte a las tres partes involucradas en el problema: el ser humano, la ganadería y la fauna silvestre.

Todo ello ha llevado a acuñar el término “One Health” (“Una Única Sanidad”) por sus creadores, la American Veterinary Medical Association: AVMA (King et al. 2008; Coker et al. 2011; Dhama et al. 2013). Se trata, en resumen, del reconocimiento científico de que la sanidad humana está estrechamente relacionada con la sanidad animal, incluyendo tanto especies domésticas como silvestres y el medio ambiente. Por tanto, es imprescindible adoptar estrategias de control de las enfermedades transmisibles que engloben los tres pilares de “Una Única Sanidad”.

La sanidad humana ha recibido tradicionalmente una mayor atención social y política y mayores inversiones económicas con una mayor dotación de efectivos humanos e infraestructuras, lo que ha supuesto una rápida mejora en la prevención y curación de las diferentes enfermedades transmisibles. Por el contrario, la sanidad animal ha preocupado tradicionalmente menos a la sociedad. Sin embargo, las últimas alertas sanitarias protagonizadas por enfermedades graves como la encefalopatía espongiforme bovina o la tuberculosis, entre otras, las restricciones al comercio impuestas por la política agraria común (PAC) de la Unión Europea y, en general, el propio interés económico, social y científico de las empresas ganaderas y de sanidad animal, han propiciado un considerable progreso científico en estos últimos años. Sin embargo, no ha sucedido lo mismo con la sanidad de la fauna silvestre, en general, y de los ungulados en particular, si bien se le está dando cada vez más importancia en los últimos años (Cunningham et al. 2017). Por tanto, el pilar más débil dentro del término “Una Única Sanidad” es la sanidad de la fauna silvestre y, en concreto, la de los ungulados, que son los que tienen una relación más directa e intensa con el ganado doméstico y los humanos. De hecho, Riviére et al. (2014), tras analizar los resultados de una encuesta realizada en los 28 estados miembros de la Unión Europea y otros 3 países no miembros (Noruega, Macedonia y Suiza) sobre las medidas de vigilancia aplicadas dentro de sus fronteras para el control de la tuberculosis en el ganado bovino y en la fauna silvestre, constataron que sólo ocho países habían puesto en marcha medidas de vigilancia (pasiva, activa o ambas) referentes a la fauna silvestre.

Las enfermedades transmisibles que afectan a la ganadería extensiva, la que cubre la mayor parte de sus requerimientos alimenticios por pastoreo (Plataforma por la Ganadería Extensiva y el Pastoralismo 2017) y, por ello, la que se sustenta en el medio natural y tiene contacto directo con la fauna silvestre, dependen de los sistemas de manejo, que han cambiado notablemente en el último medio siglo. En este periodo, los cambios socioeconómicos acaecidos en España han sido sustanciales: se ha pasado de una sociedad rural, basada en el sector primario, con escasos recursos económicos y con la necesidad de aprovechar intensiva y eficientemente los recursos naturales, a una de carácter más urbano, apoyada en los sectores terciario y en menor medida secundario,

más rica y con menor dependencia del medio natural. En el caso de la ganadería los cambios han sido muy drásticos. Por su trascendencia destacan los siguientes:

- **Reducción muy intensa de la trashumancia y, en menor medida, de la transterminancia.** Ello implica un carácter más estante de la ganadería extensiva, un aprovechamiento menos eficiente de la diversidad geográfica y estacional de los pastos de España y, por consiguiente, una mayor dependencia de la alimentación suplementaria. También, la creación y mantenimiento, siempre limitado, de los puntos de agua: lugares de concentración y contacto del ganado doméstico y la fauna silvestre y de ambos con otros hospedadores de agentes patógenos (Gómez Sal y Llorente 2004; Manzano-Baena y Casas 2010; Evaluación de los Ecosistemas del Milenio en España 2011).
- **Desaparición de los pastores profesionales,** afectando a las posibilidades de selección de especies, favoreciendo la expansión del ganado bovino, y en menor medida del equino, en detrimento del ovino y caprino. También supone un pastoreo poco o nada dirigido y, por consiguiente, menos eficiente a la hora de aprovechar los recursos naturales, y más dependiente de la suplementación y de los puntos de agua (Manzano-Baena y Casas 2010; San Miguel et al. 2017).
- **Cambios de especies, razas y modelos de gestión** (Pineda 2001; San Miguel et al. 2017). Los cambios en las preferencias de los consumidores (mayor predilección por la carne de vacuno), el enorme incremento de los ganaderos con dedicación a tiempo parcial y en cierta medida la PAC han favorecido el incremento del censo del ganado bovino extensivo, el cual prácticamente se ha duplicado en las últimas tres décadas. Por otra parte, la disponibilidad inicial de suplementos alimenticios a un precio asequible y la necesidad de incrementar las producciones han fomentado el cruce industrial (razas ganaderas autóctonas generalmente con Charolesa y Limusina). Teniendo en cuenta que los periodos de necesidades nutritivas altas son mucho más prolongados en el ganado bovino, estos cambios han conducido a una mayor dependencia de la suplementación y ello, a su vez, a una mayor densidad de animales en las proximidades de los puntos de suministro del alimento y agua facilitando la transmisión de enfermedades entre congéneres y especies de ungulados silvestres, cuyas poblaciones también han crecido de una forma exponencial, en distribución y densidades. Esta mayor densidad de animales y la facilidad de contacto entre especies domésticas y silvestres han propiciado un aumento de las epizootias y un incremento de la incidencia de las zoonosis. Las enfermedades transmisibles compartidas por el ganado doméstico y la fauna silvestre son numerosas (de etiología vírica, bacteriana y parasitaria), presentan una epidemiología diversa siendo en algunos casos compleja y se ven agravadas por el fuerte incremento en las densidades de ungulados silvestres en el área que éstos ocupan (Gortázar et al. 2006). De entre las enfermedades bacterianas, las más importantes son, probablemente, la tuberculosis, la brucelosis, la fiebre Q, la leptospirosis y la paratuberculosis, mientras que en las víricas destacan la diarrea vírica bovina (BVD), la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), Aujeszky, Schmallemberg y la lengua azul. Finalmente, entre las enfermedades parasitarias destacan la toxoplasmosis y la neosporosis. A estas enfermedades hay que añadir otras que cada vez están teniendo más relevancia como la besnoitiosis, la micoplasmosis, la enfermedad de Lyme, la anaplasmosis granulocítica humana y las piroplasmosis (Vicente et al. 2005; Gortázar et al. 2006, 2010; Rabinowitz et al. 2006; Halliday et

al. 2007; Dubey y Jones, 2008; Pato et al. 2010; Kirchgessner et al. 2013; Rivière et al. 2014; Barasona 2015; Arnal et al., 2017; IREC 2017).

La situación de la fauna silvestre también ha cambiado de una forma drástica en las últimas décadas. Hasta la segunda mitad del siglo XX, los ungulados silvestres, como especies cinegéticas, eran consideradas “*res nulus*” (algo de nadie). Por ello, eran perseguidos como fuente de proteína, algo muy escaso en la dieta humana durante siglos. Si a ello unimos que la inmensa mayoría de la población española era de carácter rural (vivía y dependía de los recursos del medio natural) y, además, soportaba unos niveles muy elevados de pobreza y precariedad, es fácil comprender que a mediados del siglo XX las poblaciones de ungulados silvestres estaban muy reducidas, tanto en distribución geográfica como en densidades poblacionales. Así, por ejemplo, el ciervo (*Cervus elaphus* L.) estaba relegado a pequeñas poblaciones ubicadas en las sierras andaluzas como Sierra Morena y Los Montes de Toledo, con densidades inferiores a 1 ind/km². El jabalí (*Sus scrofa* L.) había desaparecido de muchas provincias españolas, la cabra montés (*Capra pyrenaica* Schinz.) estuvo a punto de extinguirse y las poblaciones de corzo (*Capreolus capreolus* L.), gamo (*Dama dama* L.), sarrío y rebeco (*Rupicapra pyrenaica* Bonaparte) eran mínimas (Gortázar et al. 2000; Acevedo et al. 2011; Marco et al. 2011; Herruzo y Martínez-Jauregui 2013). Sin embargo, esta situación ha cambiado drásticamente en un periodo de tiempo muy corto. La rápida mejora socioeconómica propició el éxodo rural y una dependencia muchísimo menor de la sociedad del sector primario y de los recursos del medio natural. Por otra parte, se incrementó de forma muy notable el consumo de proteína animal procedente de la ganadería, tanto intensiva como extensiva, lo que redujo de forma muy significativa la presión sobre los ungulados silvestres. Además, el abandono del campo se tradujo en un avance muy considerable del bosque y el matorral, en detrimento de los cultivos agrícolas y ganaderos, lo que incrementó el hábitat disponible para los ungulados silvestres y su conectividad. Finalmente, la aprobación de la Ley de Caza de 1971 instituyó la posibilidad de establecer acotamientos, lo que supuso, en definitiva, la conversión de las piezas de caza en un recurso económico.

Por todo ello, en la década de los 70 del siglo XX las poblaciones de ungulados silvestres iniciaron un rapidísimo proceso de recuperación. Los propietarios de grandes fincas, que hasta entonces sólo tenían interés por la producción de leña, el carbón vegetal y el ganado caprino, empezaron a utilizarlas para la caza mayor, ya que las reses empezaron a revalorizarse por los trofeos. Por ello, comenzaron a proliferar las fincas con vallado perimetral y a incrementarse las densidades poblacionales en zonas dedicadas tradicionalmente a la agricultura y la ganadería (Delibes-Mateos et al. 2009). Finalmente, tanto en fincas gestionadas por la administración como en fincas privadas empezaron a reintroducirse ungulados silvestres. En el caso del ciervo, las reintroducciones se hicieron con ejemplares procedentes de las fincas públicas de Los Montes de Toledo (Los Quintos de Mora) y Sierra Morena (Lugar Nuevo, Contadero y Selladores) (Blanco 1998).

En la actualidad el problema de la recuperación e incremento de los censos radica en la sobrecarga y la dificultad del control poblacional (Gortázar et al. 2006; San Miguel et al. 2010; Carranza 2011). Las poblaciones se incrementan a un ritmo creciente, el número de cazadores disminuye, aumenta la presión urbana anti-cinegética y cada vez hay más situaciones donde el control poblacional o no es posible o está muy limitado. El control poblacional asociado a la caza se ha incrementado de una forma exponencial en las últimas décadas (Martínez Jauregui et al. 2011; Herruzo y Martínez Jauregui 2013),

el número de reses abatidas crece cada año y ya supera las 320.000, de las que el 90% corresponden al jabalí y al ciervo (Barasona 2015). A pesar de ello, las poblaciones siguen creciendo (Delibes-Mateos et al. 2009). Además, es frecuente la translocación de individuos (traslado de reses cinegéticas de una zona, región o país a otro) en numerosas ocasiones sin permisos y desconociendo su estado sanitario. En el caso del jabalí, para satisfacer las necesidades de cantidad y calidad (“boca”) de los cazadores, es relativamente frecuente la translocación de individuos y el empleo de los llamados “cercones”: zonas de gran densidad poblacional mantenidas artificialmente. Además, en otros sitios se ha llegado a situaciones en las que ni siquiera la actividad cinegética llega a controlar las poblaciones y los gravísimos problemas que estas causan: sanitarios (p.ej. tuberculosis y brucelosis), daños a cultivos, pérdida de biodiversidad, accidentes de tráfico, invasión del medio urbano y otros. En el caso del ciervo, la situación es menos grave, pero también preocupante (Perea et al. 2014), sobre todo en los Parques Nacionales, donde está prohibida la caza comercial y deportiva. En el caso de las fincas de propiedad privada, aunque se estima que las densidades admisibles pueden situarse en el entorno de los 20-25 ind/km² en la España mediterránea, no son raras las que superan los 50 o incluso 100 ejemplares/ km². Finalmente, también empieza a haber problemas con la cabra montés en los Parques Nacionales de Guadarrama (Perea et al. 2015) y Sierra Nevada donde se han tenido lugar graves episodios de sarna como lo ocurrido en el Parque Natural de las Sierras de Cazorla, Segura y las Villas (León-Vizcaíno et al. 1999).

La sobreabundancia de especies cinegéticas y los efectos negativos que ocasiona dependen de: i) la especie de ungulado considerada; ii) las condiciones ecológicas: clima, suelo, vegetación, estructura y composición de la comunidad faunística; iii) la densidad y la estructura poblacionales de la especie (p.ej. estructura de la población en función de la edad y el sexo) y iv) la interacción con la ganadería extensiva (Gortazar et al. 2006).

En la actualidad, la situación de las poblaciones de ungulados silvestres es bastante heterogénea en España. En la mitad septentrional predominan poblaciones abiertas, que se desarrollan en montes no vallados y, por tanto, tienen libertad de movimiento. Además, en el caso de las grandes montañas, como la Cordillera Cantábrica o los Pirineos, las nevadas invernales provocan con cierta frecuencia una mortalidad significativa, que contribuye al control de sus poblaciones. Aun así, se considera que las poblaciones de ciervo de la Cordillera Cantábrica no son sustentables en lo que respecta a su efecto sobre especies de fauna amenazada, como el urogallo cantábrico (*Tetrao urogallus cantabricus*), que se ve fuertemente afectada por el ramoneo del ciervo sobre el arándano (*Vaccinium myrtillus*), lo que ha llevado a proponer el control de las poblaciones de ciervos, como competidores, en el proyecto LIFE+Urogallo cantábrico (Fundación Biodiversidad, 2013). Del mismo modo, tanto las asociaciones de ganaderos como las ONG ambientalistas de la Cordillera Cantábrica (Gedemol, Fundación Oso Pardo, Ecologistas en Acción Cantabria, Arca, Fundación Naturaleza y Hombre, Fundación Félix Rodríguez de la Fuente, SEO BirdiLife, ACU y Filón Verde) han denunciado que el modelo cinegético implantado desde hace años en la Reserva de Caza de Riaño, basado en la sobrepoblación de ciervos y jabalíes, emulando modelos de explotación intensiva del sur de la península, está causando un aumento exponencial en la incidencia de enfermedades como la brucelosis y la tuberculosis sobre la cabaña ganadera, al actuar estos animales silvestres como reservorios de los patógenos causantes de dichas enfermedades (Carnero 2015).

En la mitad sur de la Península Ibérica, y en especial en el cuadrante suroeste, es donde predominan las fincas de caza mayor con vallado perimetral y altas densidades poblacionales, en algunas de las cuales también hay presencia, permanente o estacional, del ganado doméstico. Es en ellas donde se dan los mayores valores de prevalencia de enfermedades transmisibles, en muchos casos de carácter zoonótico. En esas fincas la gestión es muy intensa, con densidades a menudo superiores a las que puede sustentar el ecosistema, con fuerte suplementación de alimentos y minerales, con translocación de individuos y, cada vez en más casos, con una selección genética en pequeñas instalaciones a modo de granja cinegética. Se trata de fincas intensivas en la que tanto la gestión como la propia actividad cinegética son muy artificiales. Ello plantea, como es lógico, serios problemas de conservación de los ecosistemas, la flora y la fauna (González y San Miguel 2004), graves problemas sanitarios (Gortázar et al. 2006) e incluso conflictos éticos de homologación de trofeos y de “naturalidad” de la actividad cinegética. Esa situación ha llevado a varios intentos de establecer criterios para la certificación de la caza, mediante los estándares del Forest Stewardship Council (FSC: <https://es.fsc.org/es-es/certificacin/estndares-nacionales>) o mediante la actual propuesta GECISO de la Cátedra de Recursos Cinegéticos de la Universidad de Córdoba (<http://www.uco.es/crcp/>). Con respecto a la homologación de trofeos, si resulta necesario, se recurre a la comparación del ADN mitocondrial de la cuerna del animal abatido con la de trofeos de gran antigüedad que se emplean como representantes de los linajes genéticos Ibéricos puros del ciervo (Carranza et al. 2016).

Consciente de esa situación y esa necesidad, el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), aprobó en 2010 el Programa Nacional de Vigilancia en Fauna Silvestre (PNVFS) con el objetivo de conocer la situación sanitaria de la fauna silvestre española respecto a una serie de enfermedades consideradas relevantes, bien porque afectan al estatus sanitario de la cabaña ganadera, bien porque son zoonosis, porque suponen un riesgo para la conservación de especies silvestres consideradas en peligro de extinción o porque comprometen la producción cinegética. Este programa se puso en funcionamiento en 2011 y en 2015 se publicó el primer informe sobre los resultados obtenidos hasta 2015 (MAPAMA, 2015), aunque más recientemente se ha ofrecido información actualizada (MAMAPA, 2017a) (Tabla 1.1.). A efectos de muestreo, se consideran seis Unidades Biogeográficas. Los informes mencionados ponen de manifiesto que la situación sanitaria de los ungulados silvestres es significativamente peor en la Unidad Biogeográfica 3: Ecosistemas mediterráneos continentales (Andalucía, Extremadura, Castilla-La Mancha y Castilla y León), donde se concentran las fincas tradicionales de caza mayor y, en algunos casos, se mezclan o alternan con explotaciones ganaderas extensivas ligadas a la dehesa. Además, también evidencian que el número de animales seropositivos va en aumento y que la situación sanitaria de la fauna silvestre puede tener un papel significativo en la transmisión de enfermedades infecciosas al ganado extensivo. La situación parece especialmente grave en el caso del jabalí y, en mucha menor medida, en los cérvidos.

Tabla 1. Susceptibilidad a enfermedades relevantes de mamíferos terrestres y aves silvestres españoles (negro: susceptible; gris: desconocido; blanco: no susceptible) (MAPAMA, 2017a).

ENFERMEDAD	JABALÍ	CÉRVIDOS	BÓVIDOS	LAGOMORFOS	CARNIVOROS	AVES
EET'S						
FIEBRE AFTOSA						
ENF. VES. POR.						
PESTE PEQ. RUM.						
BTV						
PPC						
ENF. NEWCASTLE						
ESTOM. VESIC						
PESTE BOVINA						
FIEBRE VALLERIFT						
ECTIMA						
PPA						
INFLUENZA AVIAR						
AUJEZSKY						
BRUCELOSIS PORC.						
BRUCELOSIS BOV.						
TUBERC. BOVINA						
PARATUBERCULOSIS						
TUBERCULOSIS AVIAR						
TULAREMIA						
RABIA						
Nº TOTAL SUSCEPTIBILIDADES	15	14	12	5	9	5

EET's: Encefalopatías Espongiformes Transmisibles; BTV: Virus de la Lengua Azul; PPC: Peste Porcina Clásica; PPA: Peste Porcina Africana.

En el caso concreto de la tuberculosis, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y la AECOSAN (la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición) han puesto en marcha el Plan de Actuación sobre Tuberculosis en Especies Silvestres (PATUBES) (MAPAMA, 2017b). En él se analiza con especial detalle la situación de los hospedadores con relevancia epidemiológica, entre los que se incluyen expresamente el jabalí, el ciervo y el gamo. El informe revela tasas de prevalencia de lesiones compatibles con tuberculosis en el jabalí superiores al 50% en la España mediterránea, que además se incrementan de forma muy significativa. En concreto, se ha observado un incremento del 30% en 12 años en Ciudad Real y de un 50% en el Parque Nacional de Doñana (Gortázar et al. 2008). En el caso del ciervo, las tasas de prevalencia son claramente inferiores, pero también relativamente altas, aunque no se constata la tendencia al aumento.

En España, los esfuerzos dedicados al avance científico en el conocimiento de las enfermedades transmisibles que afectan a la fauna silvestre son muy recientes. A finales del siglo XX se inició una línea de investigación orientada al estudio de las enfermedades de etiología parasitaria (San Miguel et al. 2001, 2003), que se empezaron a realizar en la finca “Los Quintos de Mora”. Sin embargo, la mayor parte de los trabajos en esta línea han sido liderados en las últimas dos décadas por el Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), Centro mixto CSIC-UCLM, y por la Universidad de Córdoba. Se ha prestado una atención muy especial a los ungulados silvestres y, en concreto, a las principales enfermedades transmisibles que les afectan y que pueden ser compartidas con el ganado doméstico y los humanos, en particular, la tuberculosis (Gortázar et al. 2006, 2008, 2011; Castillo 2011; Balseiro y Gortázar 2015; Barasona 2015; Gortázar et al. 2015; IREC 2017). También se han abordado otros temas complementarios, como los programas de seguimiento de enfermedades transmisibles en fauna silvestre en toda España, y con especial intensidad en Castilla-La Mancha, y las relaciones existentes entre su prevalencia y las características de densidad y estructura poblacional de los ungulados (Gortázar et al. 2006; García-Bocanegra 2012, 2017) y de manejo de las fincas que las sustentan (Acevedo et al. 2008; Barasona 2015).

En la actualidad, el IREC está abordando un nuevo proyecto de investigación sobre el tema titulado “Evaluación de protocolos de bioseguridad y de la gestión de ungulados en la transmisión de enfermedades compartidas (ONEGEST)”. La idea principal es que la existencia de reservorios no controlados sanitariamente, como los ungulados silvestres, limita el éxito de los programas de erradicación de enfermedades, como la tuberculosis, en el ganado doméstico.

2.2. La especie objeto de estudio: el ciervo (*Cervus elaphus* L.)

2.2.1. Introducción

El ciervo (*Cervus elaphus* L.) es, con seguridad, la especie de caza mayor más importante de España y una de las más valoradas y ampliamente distribuidas en todo el mundo por la calidad de su trofeo, su porte y tamaño y su adaptabilidad a diversas condiciones ambientales. Además, desde hace algunas décadas esta especie es apreciada también por su potencial para ser aprovechada en régimen de semi-libertad para la producción de carne y cuernos. Por todo ello, se posee un conocimiento razonablemente bueno sobre su taxonomía, distribución, biología y etología. Sin embargo, habida cuenta de su amplia variación genética, biométrica y de hábitats, nos centraremos en la descripción de la especie presente en España.

En español, el ciervo recibe diversos nombres dependientes del sexo y la edad. El macho suele recibir el nombre de venado (del latín: “venare” = cazar), denominación que fue aplicada también a otras especies de caza mayor antiguamente. Las hembras se denominan ciervas, o vulgarmente “pepas”. Las crías de menos de un año reciben el nombre de gabatos y gabatas, mientras que las hembras de uno a dos años se denominan gabarronas o primalas y los machos de igual edad, varetos (Fig 1A y 1B), porque suelen tener una cuerna consistente en dos varas (RAE 2019).

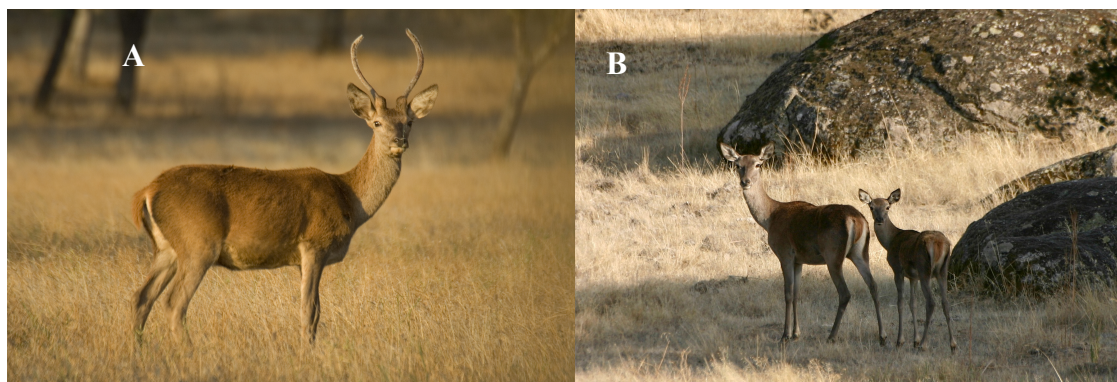


Figura 1: *Cervus elaphus hispanicus*. A: Vareto; B: Cierva con gabato.

2.2.2. Taxonomía

El ciervo se encuentra clasificado taxonómicamente dentro del Reino Metazoa, la Clase Mamalia, Orden Artiodactila, Suborden Rumiantes, Suborden Ruminantia, Familia Cervidae, Género *Cervus* y Especie *C. elaphus* L. 1758 (Carranza 2004).

Las poblaciones europeas presentan una estructura filogeográfica con tres linajes mitocondriales: occidental, oriental y mediterráneo (Carranza 2011). En la actualidad, dada la importación de ciervos procedentes de diferentes partes del mundo, se emplea el ADN mitocondrial procedente de trofeos muy antiguos para acreditar la procedencia genética española de los ciervos a efectos de homologación de trofeos (Carranza 2011; Carranza et al. 2016).

La subespecie ibérica (*Cervus elaphus hispanicus*) sólo existe en España y Portugal, y no se tiene constancia de que haya sido exportada a ningún otro lugar del mundo. En la Península Ibérica existe registro fósil de la presencia del género *Cervus* que se remonta hasta hace varios millones de años, y hay registros de la existencia de *Cervus elaphus* desde al menos el Pleistoceno superior (hace 120.000 años) (Carranza 2011).

2.2.3. Distribución

El ciervo tiene una amplia distribución mundial, que incluye toda la región de Eurasia, desde Europa occidental hasta Asia central, incluyendo las islas de Córcega y Cerdeña y el Magreb. Además, el ciervo ha sido introducido en muchas áreas del hemisferio sur, como Argentina, Chile, Australia o Nueva Zelanda, donde se ha adaptado perfectamente. En casi todos los casos se trata de una especie que está claramente en expansión gracias al alto valor que posee para el hombre.

En España, el ciervo ha estado presente en prácticamente toda su geografía aunque, debido a la alta presión cinegética, llegó casi a desaparecer a principios del siglo XX, ya que estaba presente sólo en las sierras extremeñas y andaluzas y en densidades muy bajas inferiores a 3-4 individuos/km² (Blanco 1998). Sin embargo, las mejoras económicas y sociales permitieron su reintroducción en casi toda nuestra geografía y en la actualidad su densidad es elevada.

La mayoría de los actuales ciervos españoles proceden de las poblaciones de los Montes de Toledo, Sierra Morena y otras sierras extremeñas y andaluzas. De hecho, la

mayor parte de las repoblaciones que han tenido éxito se hicieron con reses procedentes de dos fincas: Los Quintos de Mora, en Toledo, y Lugar Nuevo, en Jaén.

2.2.4. Morfología

El ciervo es el mayor de los cérvidos españoles. Los machos, dotados de cuernas que caen todos los años (Fig. 2A), son mucho mayores que las hembras, que carecen de ellas (Fig. 2B). En la España mediterránea, los machos adultos de más de tres años pesan, por término medio, unos 110-130 kg (variable según la alimentación). Las hembras, por su parte, suelen pesar unos 70-80 kg. Sin embargo, en el norte de la península o en condiciones de buena alimentación, los machos pueden superar los 200 kg y las hembras, los 100 kg. Tanto el peso vivo como el tamaño de las cuernas dependen muy estrechamente de la alimentación de las reses.

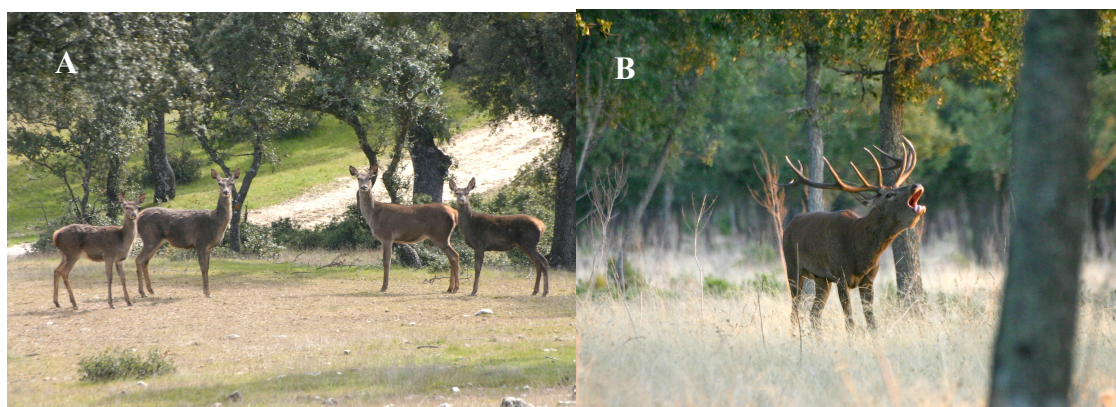


Figura 2: Adultos de ciervo. A: Grupo de hembras; B: Macho

La dentadura es similar a la de otros ruminantes, y en los adultos presenta la fórmula 0-0-3-3/3-1-3-3. El canino inferior es incisiforme. Los molares y premolares, especialmente diseñados para la rumia, se van desgastando con la edad y es precisamente su desgaste lo que determina la duración de la vida de las reses, que no suele superar los 15 años, aunque puede llegar a los 20, sobre todo en las hembras. Por ello, la edad se puede determinar por la dotación dentaria y por el desgaste de sus piezas (Azorit et al. 2002). Si se desea una mayor precisión, se puede recurrir a la extracción del primer incisivo inferior, su descalcificación, su corte y el recuento de las capas de cemento dentario al microscopio.

En los machos, las cuernas aparecen después del primer año. En ese momento, reciben el nombre de machos de 1ª cabeza; el año siguiente, de 2ª, y así sucesivamente. El tamaño y el número de puntas de los ciervos no indican su edad, ya que dependen en gran medida de su alimentación. Así, podemos indicar que es posible que un macho de entre uno y dos años llegue a tener 6 puntas, mientras que uno de tres años, puede tener 2 puntas (en este caso el adulto se distingue de un vareto por la existencia de la roseta basal).

La cuerna del ciervo tiene varias partes claramente diferenciadas. Se asienta sobre un pivote óseo, y la zona de contacto, que se denomina roseta, posee una base que puede

ser convexa en los individuos jóvenes, llana en los maduros y cóncava en los viejos. El resto de la cuerna está constituido por un eje (percha, astil o tallo), del que van saliendo las puntas o candiles. Empezando desde la base de la cuerna, la primera punta se denomina luchadera, y la segunda, contraluchadera. En los machos maduros, el extremo distal de la cuerna consta de varias puntas dispuestas en forma de corona, por lo que recibe tal nombre. Cuando las cuernas no están ramificadas, y se reducen a dos varas, los machos se denominan varetos. Si esas varas terminan solamente en dos puntas, el nombre que se le asigna al individuo es horquillón (Fig. 3).

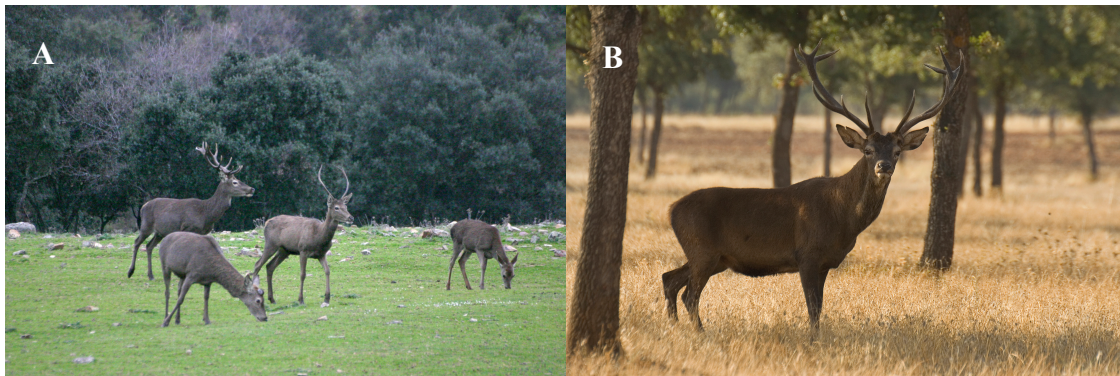


Figura 3: Machos de ciervos con diferente grado de desarrollo de la cuerna. A: Imagen de un venado desmogado, un venado con cuerna y un horquillón junto a una cierva. B: Venado adulto con una cuerna de 14 puntas.

La cuerna del ciervo cae todos los años y, habitualmente, lo hace en los meses de marzo-abril. Tanto ese proceso como las cuernas caídas reciben el nombre de desmogues. Tras el desmogue se inicia el proceso de formación de las nuevas cuernas (generalmente mayores que las anteriores), proceso que dura uno o dos meses. Esas cuernas están recubiertas inicialmente por una especie de terciopelo, poseen una densa red de capilares sanguíneos y son muy apreciadas por sus supuestas cualidades medicinales y afrodisiacas en la medicina asiática, por lo que adquieren un gran valor en el mercado. Poco a poco ese terciopelo (velvet) se va endureciendo (Fig. 4) y los machos proceden a desprenderlo rascándose con la corteza de los árboles. Tras este proceso, denominado descorreado, las cuernas cambian su color blancuzco por el habitual pardo-negrusco. Para el descorreado, los machos suelen elegir árboles concretos, generalmente coníferas o especies con alto contenido en taninos como la cornicabra, y provocan en ellos daños (escodado) que con cierta frecuencia llegan a causar su muerte por anillamiento. Las cuernas alcanzan su apariencia definitiva en julio. Es habitual que la presencia de cuernas en velvet durante el verano sea considerada una señal de mala alimentación o de escaso desarrollo en los machos, por lo que se suele emplear como criterio para la caza selectiva.



Figura 4: Venados con velvet.

2.2.5. Hábitat

El ciervo es un animal que habita en el borde del bosque, ya que necesita la vegetación leñosa densa como refugio y los claros para alimentarse.

Cuando las poblaciones de ciervo ocupan amplias zonas de montaña, si las mallas cinegéticas no lo impiden, son habituales las migraciones estacionales para buscar los pastos verdes y de calidad durante la época de lactación de las crías (finales de primavera y verano) y refugio frente al frío durante el invierno. Desde finales del invierno hasta el siguiente otoño, es decir, durante el final de la época de gestación y toda la lactación, los machos suelen ocupar zonas diferentes a las de los rebaños de hembras y crías, lo que permite reducir la competencia intraespecífica y facilita la búsqueda de alimento de calidad a las hembras, ya que éstas tienen elevados requerimientos nutritivos para el cuidado de las crías.

En el caso del ciervo ibérico los estudios realizados en la Península Ibérica describen áreas de campeo menores que las descritas en el norte y centro de Europa, y en todos los casos áreas de campeo mayores para los machos que para las hembras. En el Parque Nacional de Monfragüe, mediante el seguimiento de animales marcados y equipados con collares radioemisores, se encontraron tamaños de áreas de campeo de aproximadamente 250 ha para las hembras y de 655 ha para los machos. En Sierra Morena se obtuvo un tamaño medio de área de campeo de 1.185 ha para los machos y de 417 ha para las hembras (Lazo et al. 1994, Soriguer et al. 1994). En el Parque Nacional de Doñana, también mediante el radiomarcaje de individuos adultos, se ha encontrado una gran variación en el tamaño del área de campeo entre individuos, cuyo promedio osciló entre 1.050 ha para los machos y 240 ha en el caso de las hembras. Este menor tamaño de las áreas de campeo del ciervo en la Península Ibérica podría reflejar la idoneidad de los ecosistemas mediterráneos para esta especie, que además presentan mayores densidades que la mayoría de los ecosistemas más norteños (Carranza 2011).

2.2.6. Reproducción

Los machos y hembras del ciervo tienen preferencia y comportamientos muy diferentes; tanto, que Clutton-Brock et al. (1982) llegaron a tratarlos como si fuesen dos especies diferentes.

Las hembras son poliéstricas estacionales. Normalmente, por selección natural, el periodo de lactación (en el que las necesidades alimenticias de las hembras son máximas) coincide con épocas de abundancia de alimento de calidad. En España, el periodo de celo habitual es el otoño, y más concretamente los meses de septiembre y octubre, aunque puede retrasarse si la condición corporal de las hembras es mala. El periodo de gestación es de 8 meses y los nacimientos de las crías suelen concentrarse a finales de mayo y durante el mes de junio. El periodo de lactación suele finalizar al producirse el siguiente periodo de celo de la madre.

Aunque cada macho suele cubrir a varias hembras (poliginia), no es raro que una hembra pueda ser cubierta por dos o más machos porque, realizada la cópula con uno, la hembra puede cambiar de grupo y ser cubierta por otro macho en un breve intervalo de tiempo. Si una hembra no se llega a quedar preñada durante un celo, puede quedarse en el siguiente.

Como en todos los ungulados, la fertilidad de los machos y de las hembras está estrechamente relacionada con el peso y la condición corporal de los individuos y también con la posición jerárquica del individuo y la disponibilidad estacional de alimento (Peláez et al. 2017). De ese modo, las primeras hembras en entrar en celo y los primeros machos en cubrirlas suelen ser los animales dominantes. Luego, poco a poco van entrando en celo hembras secundarias desde el punto de vista jerárquico, que también son cubiertas por machos de segundo rango. La fertilidad es baja en las primas, normalmente de alrededor de un 20% (pueden parir las que superan 50 kg de peso vivo o 2/3 del de una hembra adulta), es máxima (60-80%) en hembras de 3 a 10 años y suele descender a partir de los 10 años, porque aproximadamente a esa edad la dentadura está ya muy desgastada dificultando la alimentación y, por tanto, la condición corporal y el peso disminuyen (Peláez et al. 2017).

2.2.7. Alimentación

La alimentación es especialmente importante para los gestores de fincas de caza mayor. En general, es necesario conocer no sólo las necesidades alimenticias de las reses en función de su peso y su actividad, sino también sus pautas de selección de dieta porque de ellas dependen sus posibilidades de pastoreo y su efecto sobre la vegetación.

El ciervo es un animal herbívoro oportunista, ni tan pastador como las ovejas o los muflones, ni tan ramoneador como el corzo, ya que prefiere alimentarse de hierba verde de calidad, pero si esta falta o es escasa llega a cubrir un alto porcentaje de sus necesidades alimenticias con el ramoneo, es decir, mediante el consumo de hojas y brotes de árboles y arbustos. En la España mediterránea el ciervo ramonea sobre todo en invierno, cuando la producción de hierba verde es muy escasa y en verano, cuando la hierba está agotada y tiene una peor calidad nutritiva (Pérez-Carral et al., 1993; San Miguel et al., 2000). Una forma de gestionar racionalmente la alimentación en determinadas fincas consiste en habilitar zonas destinadas a la siembra de avena y cebada, que se protegen

con vallado perimetral y se abren en las épocas de mayor carestía (invierno) o cuando las necesidades de las hembras aumentan al estar en el periodo de lactación (verano) (Fig. 5).



Figura 5: Gestión de pastos en fincas cinegéticas. A: Pradera de regadío; B: Zona de siembra de cereal.

2.2.8. Etología

El ciervo es una especie gregaria, mucho más que el corzo (*Capreolus capreolus*), pero no tanto como el gamo (*Dama dama*). Los machos y hembras se mantienen en grupos separados durante la mayor parte del año, exceptuando la época de celo. En las hembras, la unidad social básica es el grupo familiar, liderado por la hembra de más edad, seguida por la cría del año, la del año anterior (hembra joven o primala o vareto si es macho), e incluso la hija de dos años de edad si fue hembra. Dado que las hembras cuando crían por primera vez tienden a establecer áreas de campeo que se solapan con las de sus madres, es frecuente que las familias emparentadas coincidan en las mismas áreas de alimentación y formen temporalmente agrupaciones de varias familias (Clutton-Brock et al. 1982; Carranza 2011) (Fig.6).



Figura 6: Grupo familiar de ciervas.

Los machos tienden a reunirse en grupos de edad similar, dentro de los cuales establecen una fuerte jerarquía lineal de dominancia. En los grupos de hembras existen,

igualmente, relaciones jerárquicas, siendo la hembra líder la dominante. Sin embargo, el comportamiento de la hembra dominante provoca cambios en las relaciones de dominancia de los demás miembros de la familia, favoreciendo por ejemplo a la cría o al vareto en las etapas previas a su independencia del grupo familiar (Clutton-Brock et al. 1982; Carranza 2011).

2.3. El sitio de ensayo: la finca “Los Quintos de Mora”, Los Yébenes, Toledo

La finca “Los Quintos de Mora”, donde se han obtenido las muestras analizadas en los diferentes estudios de la presente tesis doctoral, está ubicada en la comarca de las Guadalerzas, en el término municipal de Los Yébenes (Toledo) y es propiedad del Organismo Autónomo Parques Nacionales.

A continuación, basándonos en el trabajo de San Miguel et al. (2011) transcribiremos un resumen de las características esenciales de la finca, que a nuestro entender son aquellas que enmarcan la situación de la población de ciervos que estudiamos.

2.3.1. Estado legal

La finca comprende 6864 ha, ubicadas en el término municipal de Los Yébenes (Toledo), en el corazón de los Montes de Toledo, una zona característica y emblemática en el ámbito de la caza mayor en España. Se trata de una finca estatal cuya gestión depende del organismo autónomo Parques Nacionales y comprende una zona de monte de utilidad pública con servidumbres de paso y que se gestiona como coto privado de caza.

2.3.2. Historia

La presencia humana en la zona es muy antigua, con evidencias de uso de los recursos naturales desde la edad de Bronce. Desde entonces, la actividad humana se ha intensificado modelando el paisaje.

La fundación de Los Yébenes, así como la IV Calzada romana que atraviesa el término, se atribuyen al emperador Trajano. La dominación árabe, a la que se debe el nombre (Los Yébenes = los montes, de Djebel, montaña) se remonta a comienzos del siglo X. Los Montes de Toledo fueron zona fronteriza desde 1085, cuando Alfonso VI conquistó Toledo, hasta la batalla de las Navas de Tolosa, ganada por Alfonso VIII en 1212.

Los Montes de Toledo se denominan así porque fueron propiedad de la ciudad de Toledo, que los compró en 1246 al rey Fernando III el Santo. En 1829, con el inicio de las desamortizaciones, la finca Los Quintos de Mora fue adjudicada al pueblo de Mora de Toledo. En 1942 el Patrimonio Forestal del Estado (PFE) adquirió la finca y repuebló las zonas más deforestadas con pinos, oficialmente sólo con pino negral (*Pinus pinaster*) pero en la práctica también con pino piñonero (*Pinus pinea*).

Antes de su adquisición por el PFE, las zonas llanas de la finca, de calidad agrológica marginal, habían sido cultivadas en ciclos plurianuales para cereal con

producciones bajas. Asimismo, se autorizaban rozas eventuales tras la quema de matorral bajo. También ha habido un amplio aprovechamiento pastoral hasta mitad del siglo XX, tanto con cabras en el monte, como con ovejas en los pastos más abiertos y con colmenas en todo el territorio. El aprovechamiento de la leña para carbón vegetal ha sido muy intenso hasta mitad del siglo XX, como todavía atestiguan antiguas carboneras.

Hasta las décadas de los años 50 y 60 del siglo XX hubo ganado en la finca. Sin embargo, desde entonces éste desapareció y la caza mayor no ha estado en contacto con la ganadería.

2.3.3. El ecosistema: ecología y funcionamiento

2.3.3.1. Geografía y orografía

La topografía de la finca presenta forma de cubeta, con sierras de solana (al norte, con exposición sur) y umbría (al sur, con exposición norte) y una amplia raña (depósito de cuarcitas, mezcladas con arcillas o arena, que se extiende junta a una cordillera) ubicada entre ambas (Fig. 7).



Figura 7: Finca Los Quintos de Mora. De izquierda a derecha: zona de umbría, raña y zona de solana.

2.3.3.2. Hidrografía

Por la raña transcurre el arroyo de las Navas, al que se unen otros procedentes de las zonas de umbría y solana, todos ellos con un cauce estacional. También hay algunos manantiales permanentes, uno de ellos con una interesante turbera que ha motivado su declaración como micro-reserva.

Para permitir un fácil acceso de la fauna silvestre al agua se han construido numerosas balsas y un pequeño embalse sobre los cauces de los arroyos, pretendiendo que su distribución sea homogénea dentro de la finca.

2.3.3.3. Clima

El clima de la zona es de tipo Mediterráneo que varía de seco a subhúmedo con gran variabilidad interanual (precipitaciones y temperaturas) que es necesario tener en cuenta a efectos de gestión. Las heladas no son muy fuertes (temperaturas mínimas de -5° a -10°C).

2.3.3.4. Geología, litología y suelos

Los materiales datan de la época del Paleozoico y, en particular, del Ordovícico. Hay dominio de cuarcitas, cuya fragmentación y acumulación da origen a las típicas pedrizas de las laderas y a las rañas del somonte. También, aunque con menor frecuencia, aparecen pizarras, areniscas y conglomerados.

Los suelos son ácidos, poco fértiles y con valores bajos de pH de alrededor de 5. En cumbres y zonas altas de las laderas abundan los litosoles y regosoles dístricos y en las laderas dominan perfiles algo más evolucionados: cambisoles dístricos y húmicos. En las rañas aparecen los suelos más evolucionados (luvisoles crómicos), aunque muy pedregosos, con un típico horizonte argílico que favorece el encharcamiento y dificulta la penetración de las raíces de algunas especies arbóreas, como *Pinus pinaster*, que muere por hidromorfía en épocas de encharcamiento.

2.3.3.5. Flora y vegetación

Con relación a la biogeografía la finca se ubica en la región Mediterránea; subregión Mediterránea occidental; provincia Mediterránea ibérica occidental; subprovincia luso-extremaduraense; sector toledano-tagano; subsector oretano; distrito montitoledano.

En las laderas predomina la encina (*Quercus rotundifolia*) y el quejigo (*Quercus faginea broteroi*), a menudo con portes arbustivos por uso de monte bajo, arce de Montpellier (*Acer monspessulanus*), madroño (*Arbutus unedo*), brezo blanco (*Erica arborea*) y olivilla (*Phillyrea angustifolia*). En las zonas más degradadas aparecen jaral-brezales (*Erica australis*, *E. scoparia*, *E. umbellata*, *Cistus laurifolius*, *C. ladanifer*, *C. populifolius*), jarales y jaral-romerales (*C. ladanifer*, *Rosmarinus officinalis*, *Genista hirsuta*) o, incluso, cantuesar-tomillares (*Lavandula stoechas*, *Thymus masticina*...).

En el sopié y en la raña, sobre los mejores suelos, dominan formaciones más o menos adehesadas de encinar-quejigar o quejigar, a menudo sobre terrenos labrados en ciclos plurianuales. Los melojares, a menudo montes bajos de talla alta o fustales sobre cepa, aparecen en las zonas más húmedas de umbría y solana. Las formaciones de fresneda, muy aclaradas por el hombre y alteradas por el ramoneo, siguen los cursos de los arroyos, beneficiándose en la raña de los horizontes argílicos. En su dominio aparecen pequeñas manifestaciones de tamujar (*Flueggea tinctoria*). Los pinares de la raña presentan diversas estructuras: desde masas muy densas, sin tratamiento, orientadas a

La finca cuenta también con un importante elenco de especies de aves catalogadas. De entre ellas dominan el águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*), el buitre negro (*Aegypius monachus*), la cigüeña negra (*Ciconia nigra*). A ellas se unen otras muchas rapaces: águila real (*Aquila chrysaetos*), águila culebrera (*Circaetus gallicus*), águila calzada (*Hieraetus pennatus*), azor (*Accipiter gentilis*), alimoche (*Neophron percnopterus*), buitre leonado (*Gyps fulvus*), búho real (*Bubo bubo*) y una gran diversidad de passeriformes, que son objeto de seguimiento, en especial su reproducción en nidales.

Entre los pequeños mamíferos destaca la nutria (*Lutra lutra*), a la que acompañan tejones (*Meles meles*), jinetas (*Genetta genetta*), garduñas (*Martes foina*), gatos monteses (*Felis sylvestris*), turones (*Mustela putorius*), comadreja (*Mustela nivalis*) y zorros (*Vulpes vulpes*).

Los reptiles y anfibios, sin ser abundantes, son frecuentes. Destacan el lagarto ocelado (*Lacerta lepida*), las lagartijas colilarga (*Psammodromus algirus*), lagartija cenicienta (*Psammodromus hispanicus*), lagartija colirroja (*Acanthodactylus erithrurus*), lagartija común (*Podarcis hispanica*), la salamanquesa (*Tarentola mauritanica*), culebra bastarda (*Malpolon monspessulanus*), culebra de escalera (*Elaphe scalaris*), culebra de herradura (*Coluber hippocrepis*), culebra viperina (*Natrix maura*), culebra de collar (*Natrix natrix*) y la víbora hocicuda (*Vipera latasti*). Los anfibios más abundantes son la rana común (*Rana perezii*), el sapo común (*Bufo bufo*), el sapo corredor (*Bufo calamita*), el gallipato (*Pleurodeles waltl*) y las salamandras (*Salamandra salamandra*). De entre los peces, obviamente escasos por la ausencia de verdaderos ríos, merece especial atención el protegido calandino (*Iberocypris alburnoides*).

2.3.4. Poblaciones de ungulados silvestres

2.3.4.1. Ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*)

Su población en el periodo de estudio ha oscilado entre los 29 y los 40 ind/km² (ver apartado de estimación de su densidad que se incluye a continuación), la cual se considera alta, sin ser excesiva, ya que la oferta de alimento, agua y refugio es buena y está bien distribuida. Cada año crece aproximadamente un 20%. Por tanto, sería necesario extraer cada año un mínimo de 500 reses para mantenerla.

La gestión del hábitat del ciervo incluye zonas de bosque, arbustado, matorral, pastos naturales, cultivos y charcas para asegurar una oferta adecuada de alimento, agua y refugio, tanto en cantidad como en reparto espacial por toda la finca. No se aporta alimento suplementario, salvo en años muy malos. La idea es que las reses tienen que cubrir razonablemente bien sus necesidades alimenticias y nutritivas con los recursos herbáceos de la finca en un año medio.

La densidad de ciervos de Los Quintos de Mora se evalúa mediante muestreos todos los años. A continuación, incluimos un resumen de los trabajos realizados con los datos en el periodo de años que corresponde a nuestro estudio (Peláez 2017).

Para estimar la densidad de ciervos en la finca Los Quintos de Mora se ha utilizado el método conocido como “distance sampling”. Para ello, se diseñaron 9 transectos de diferente longitud, 8 itinerarios paralelos en dirección ONO-ESE, separados entre sí por una distancia aproximada de 1 km, y otro perpendicular y fuera del área de muestreo de los anteriores (Fig. 9). Los censos se realizaron durante el periodo de berrea (finales de

septiembre–principios de octubre), recorriéndose a pie dos veces al año, en días sucesivos, comenzando cada vez por un extremo distinto. El censo fue realizado por personal experto de la finca (9 personas, una por transecto) que iniciaron el recorrido simultáneamente tres horas antes de la puesta del sol, cubriendo el período de máxima actividad del ciervo (Alvarez et al. 1988; Clutton-Brock et al. 1982).



Figura 9. Transectos empleados para estimar el censo de ciervos en Los Quintos de Mora.

Para cada observación se apuntó el número de transecto, el hábitat en el que se encontraba el animal y la distancia perpendicular a la línea del transecto o, en el caso de los grupos, la distancia desde el centro del grupo. También se anotó el número de individuos en función del sexo y la edad: crías (menos de 1 año), machos y hembras jóvenes (entre 1 y 2 años), machos adultos y hembras (mayores de 1 año).

En muchos estudios, tanto la densidad como la detectabilidad de los animales están en función del tipo de hábitat. En esos casos lo correcto sería realizar el diseño de los transectos estratificado por tipo de hábitat. Sin embargo, debido a la estructura de mosaico de hábitat de la finca, esto no es posible. Por ello, los transectos se diseñaron sin estratificar y, simplemente, durante el transecto se anotó el tipo de hábitat donde fue detectado el individuo o el grupo.

Posteriormente, en la fase de análisis, se realiza una post-estratificación por tipo de hábitat, donde se estratifican tanto el esfuerzo de muestreo (número de km recorridos por cada hábitat) como las detecciones, para finalmente estimar una función de detección específica para cada hábitat y así calcular la densidad.

La estratificación de la finca se realizó mediante la elaboración de un mapa de hábitat. Con el término hábitat se describe la combinación de las categorías de estructura de vegetación y de pendiente, definidas e ilustradas en los siguientes mapas. Se combinaron estas categorías porque parecen ser las variables que condicionan a la especie durante la estación reproductora en el proceso de selección de hábitat. De este modo, de los 9 transectos originales se han agrupado en 5 tipos de hábitat (Fig.10; Tabla 2).

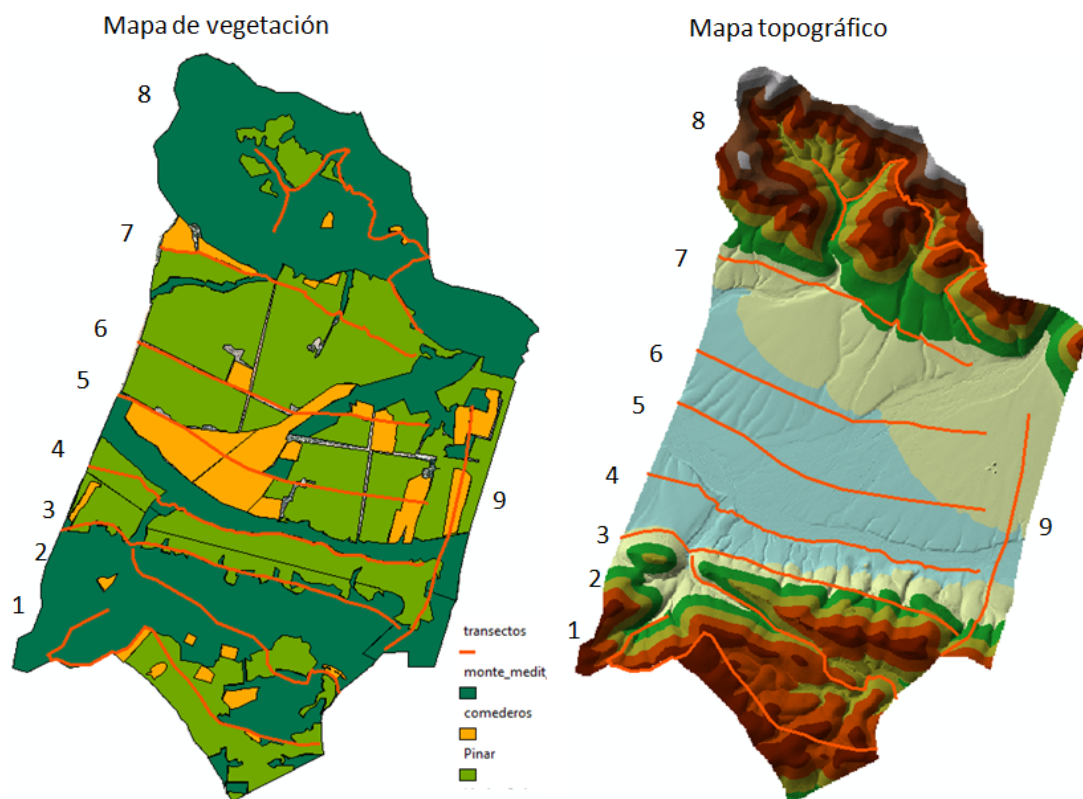


Figura 10: Estratificación de Los Quintos de Mora por topografía y vegetación, que ha sido empleada para la realización de los transectos orientados al muestreo de la población de ciervos.

Tabla 2. Agrupación de transectos para muestreo de la población de ciervos por tipo de hábitat.

Habitat	Zona	Vegetación	Área total (km2)	Longitud de transecto (m)	Visibilidad máxima (m)
0	Umbría/ Solana	Comederos	1.17	1568	200
1	Raña	Comederos	4.89	5087	300
2	Raña	Dehesa con matorral	4.20	6761	245
3	Raña	Pinar	21.83	14711	280
4	Umbría/ Solana	Monte mediterráneo	26.02	16763	120
5	Umbría/ Solana	Pinar	6.97	9638	115

El tratamiento de los datos se ha desarrollado con el paquete “Distance” del software R. Para definir el modelo que mejor se ajusta a los datos se han definido 3 modelos y sus series de expansión:

- Half normal (Cosine y Hermite Polynomial)
- Hazard Rate (Cosine y Simple Polynomial)
- Uniform Cosine

Habitat 0: Comederos en la solana y umbría

En el caso de los comederos situados tanto en la umbría como en la solana, las observaciones se han considerado conteos directos. Son un caso excepcional, debido a la pequeña área que se muestrea y a la gran visibilidad que existe. Como suponemos que todos los individuos en el transecto de ancho de banda $w=200$ m son detectados, la densidad será igual al número de individuos observados (n) dividido por el área total estudiada $a=2wL$, donde L es la longitud total del segmento de transecto que pasa por el comedero multiplicado por dos para dar cuenta de que la observación se hace a ambos lados del recorrido. Después la densidad estimada para el área muestreado se extrapola al área total de ese hábitat.

Habitat 1 y 2: Comederos y áreas adehesadas en la raña

Las zonas de comederos y de dehesa con matorral de la raña han mostrado un mejor ajuste con los modelos Hazard rate coseno. Al ser áreas muy abiertas y con gran visibilidad, existe cierta huida de los animales antes de ser detectados.

Además, en estas zonas, los animales se encuentran agregados en grandes grupos. Existen sesgos en la estimación de los tamaños de los grupos puesto que a mayores distancias de la línea los grupos grandes son más fácilmente detectables y, además, a grandes distancias resulta más complicado dividir los grupos en subgrupos. Se detectó la existencia de correlación positiva entre el tamaño del grupo y la distancia. Por ello, en el modelo hazard rate se introdujo el tamaño del grupo como covariable para la estimación de la abundancia y la densidad. Una estimación precisa de la media del tamaño de los grupos es fundamental para la estimación de la densidad.

Habitat 3 y 5: Pinar

Por otro lado, la zona de pinar se ajusta mejor a la curva half normal coseno. En ambos casos el pinar se sitúa en áreas con poca pendiente o ligeramente ondulado y es la vegetación el factor determinante en la detectabilidad. Sin embargo, no se introdujo el tamaño de grupo como covariable puesto que la varianza del tamaño de grupo se mantuvo dentro de unos límites aceptables.

Habitat 4: Monte de quercíneas en la sierra

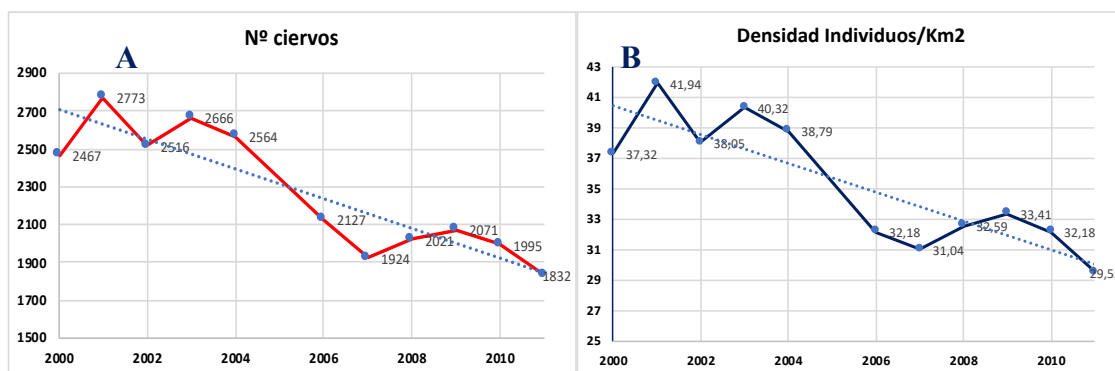
Mientras que la estructura de la vegetación es el factor determinante en la raña y en el pinar, en las zonas de monte mediterráneo de la sierra, se combina con el relieve: en estas zonas los itinerarios fueron realizados mayoritariamente por fondos de valle o laderas donde la visibilidad es mayor sobre la vertiente contraria a la del transecto. En estos casos la curva que mejor se adapta es la uniforme coseno puesto que la visibilidad en gran parte de la ladera es bastante homogénea y sólo disminuye al final con la distancia. Al igual que en el caso del pinar, no se introdujo el tamaño de grupo como covariable puesto que el tamaño del grupo fue bastante homogéneo, existiendo solamente pequeños grupos.

Los resultados del muestreo de la población de ciervos se exponen en la Figura 11. A lo largo de los 12 años de muestreo se aprecia una disminución en la población de ciervos en la finca debida a la intensificación de la caza dirigida principalmente a la consecución de este objetivo. En los últimos 6 años se ha conseguido un aumento de precisión en los cálculos debido a que durante estos años cada transecto fue ejecutado

siempre por la misma persona año tras año, puesto que la subjetividad de diferentes observadores añade bastante error a los cálculos.

Figura 11. Evolución de la población de ciervos de Los Quintos de Mora estimada mediante muestreo por transectos.

A: Número de individuos; B: Densidad de individuos.



2.3.4.2. Jabalí (*Sus scrofa*)

El jabalí es un animal omnívoro que suele tener dos partos por año, aunque si el alimento es escaso puede tener sólo uno. Las hembras son muy precoces y pueden parir con 1 año. Se estima que cada año cada hembra saca adelante dos crías, como media. Es un predador de especies de caza menor (huevos, crías), por ello es difícil compatibilizar ambas modalidades de caza en esta finca.

Se caza en montería, batida o esperas. La mayor parte de los individuos abatidos son muy jóvenes, de menos de un año. La proporción de individuos de menos de un año se sitúa alrededor de un 70-75%. Se trata de una especie cuyos movimientos son muy difíciles de controlar con las vallas. Su densidad varía mucho de forma intra- e inter-anual y su estimación es muy difícil.

2.3.4.3. Gamo (*Dama dama*) y corzo (*Capreolus capreolus*)

Ambas especies son muy escasas. En la actualidad, la población de corzo se ha recuperado de forma significativa gracias a la translocación de individuos a un cercón, actualmente abierto, y a la reducción de las densidades de ciervo.

2.4. Agentes transmisibles implicados en fallo reproductivo en rumiantes domésticos y silvestres

2.4.1. Sanidad del ciervo en España

La situación sanitaria del ciervo en España ha sido bien sintetizada por Carranza (2011) en la Enciclopedia Virtual de los vertebrados españoles. A continuación, se hace una breve mención a aquellas enfermedades transmisibles y relevantes por su papel zoonótico o impacto en las producciones descritas en el ciervo en España.

La presencia de los parásitos en las poblaciones de ciervos se ve afectada por las condiciones medioambientales presentando variaciones interanuales. Los parásitos han co-evolucionado con los ciervos en los ecosistemas mediterráneos y hay pocos ejemplos de infecciones parasitarias que afecten drásticamente a la supervivencia, el desarrollo o la reproducción en las poblaciones naturales del ciervo (Vicente et al. 2004). En este sentido tan solo destacan varios casos de sarna sarcóptica en una población de ciervos de Asturias (Oleaga et al. 2008). Por su importancia zoonótica cabe destacar también la abundante presencia estacional de ixódidos en los ciervos (Hueli y Díaz-Saez 1987; Estrada, 1995; García Romero et al. 2000), que pueden ser portadoras de *Borrelia burgdorferi* (Spielman et al. 1985), *Anaplasma marginale* (Habela et al. 2000; De la Fuente et al. 2004) o *Ehrlichia phagocytophila*, la única especie de este género descrita en España (García Pérez et al. 2000). También tienen importancia las piroplasmosis, por la abundancia de vectores potenciales y su interacción con el ganado doméstico (Olmeda et al. 2000a, b; Olmeda et al. 2001). Las garrapatas más abundantes en ciervos son *Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus annulatus* y *Rhipicephalus bursa*, entre un total de diez especies encontradas (Ruiz-Fons et al. 2006).

En cuanto a las enfermedades de etiología bacteriana descritas en el ciervo (Arenas et al. 1991), destacan la brucelosis (León-Vizcaino et al. 1985), la pasteurelosis (Arenas et al. 1997), la queratoconjuntivitis (Gortázar et al. 1998) y la clamydiosis (Cubero-Pablo et al. 2000). Así mismo, se han detectado anticuerpos frente a varios serotipos de *Leptospira* spp. (Espí et al. 2010; San Miguel et al. 2017), una prevalencia del 30,16% de paratuberculosis en ciervos ibéricos (Reyes-García et al. 2008) y un incremento de la prevalencia de la tuberculosis en ciervos desde 1997 hasta la actualidad (Gortázar et al. 2006, 2008, 2011; Parra et al 2006; Barasona 2015), sobre todo en la mitad meridional de la Península Ibérica.

Finalmente, los diferentes estudios realizados en nuestro país con relación a las infecciones por protozoos formadores de quistes (*Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*), bacterias zoonóticas como *Brucella* spp. *Leptospira* spp. y *Clamidia* spp., junto con infecciones víricas como la diarrea vírica bovina (BVD), la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), la lengua azul y Schmallenberg se resumen en el apartado 2.4.2., las cuales son objeto de estudio en la presente tesis doctoral.

En las poblaciones de ciervos de fincas cinegéticas se están detectando ciertas enfermedades que hasta el momento no se habían encontrado en esta especie o bien se están describiendo valores de prevalencia más elevados de lo esperado. En muchos casos las agregaciones de individuos y el contacto con el ganado doméstico están detrás de estos problemas (Castillo et al. 2010, 2011).

2.4.2. Enfermedades parasitarias

2.4.2.a. Neosporosis

La neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita producida por *N. caninum* y considerada como una de las principales causas de fallo reproductivo en el ganado bovino. Clínicamente se caracteriza por producir muerte fetal. La neosporosis también puede afectar al ganado ovino y caprino, aunque su frecuencia e importancia es menor que en la especie bovina.

2.4.2.a.1. Etiología

El agente etiológico es *N. caninum*, un protozoo intracelular parásito descubierto en 1988 (Dubey et al. 2002), con distribución en todo el mundo (Dubey y Schares 2011), perteneciente al subphylum Apicomplexa (Sin. Sporozoa), clase Coccidia, orden Eimeriida, familia Sarcocystidae y subfamilia Toxoplasmatinae. Esta subfamilia incluye los géneros *Toxoplasma*, *Hammondia* y *Besnoitia* (Dubey et al. 2007).

2.4.2.a.2. Ciclo biológico y transmisión

El ciclo biológico de *N. caninum* es heteroxeno facultativo, interviniendo un hospedador definitivo y otro intermediario, donde tienen lugar la reproducción sexual y asexual del parásito (Dubey y Shares, 2011).

Se conocen tres estadios parasitarios: el taquizoíto, el bradizoíto presente en el interior de quistes tisulares en el SNC y la musculatura esquelética y el esporozoíto en el interior de los ooquistes. Los dos primeros se encuentran en el hospedador intermediario, siendo los taquizoítos la fase de multiplicación rápida y responsables de la diseminación del parásito en el hospedador, lo que conduce al daño tisular, la transmisión transplacentaria y el aborto durante la fase aguda de la infección. Con el desarrollo de la respuesta inmunitaria en el hospedador, el taquizoíto se transforma en bradizoíto, dando lugar a quistes tisulares localizados en el cerebro y tejido muscular (Peters et al. 2001). El otro estadio parasitario, los esporozoítos incluidos en el interior de los ooquistes, son eliminados en las heces al medio ambiente por el hospedador definitivo, siendo la forma de resistencia del parásito en el medio ambiente.

Los únicos hospedadores definitivos identificados hasta el momento son los cánidos (*Canis lupus familiaris*), lobos grises (*Canis lupus*), coyotes (*Canis latrans*) y dingos (*Canis lupus dingo*). Se ha considerado la posibilidad de que el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) pueda ser una fuente de infección para el ganado bovino, ya que en Bélgica se encontró un 17 % de seropositividad en el zorro rojo (Simpson 2002; Buxton et al. 1997). Sin embargo, posteriormente, en un estudio en Alemania no se pudo confirmar la detección del DNA del parásito en muestras de 528 zorros rojos (Constantin et al. 2011).

En lo referente a los hospedadores intermediarios, además de la especie bovina (*Bos taurus*), se ha aislado *N. caninum* de una gran variedad de especies como la oveja (*Ovis ovis*), búfalo de agua (*Bubalus bubalis*), bisonte europeo (*Bison bonasus bonasus*), el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y el ciervo moteado (*Axis axis*) (Dubey y Schares 2011). Se ha descrito la presencia del parásito mediante técnicas inmunohistoquímicas o moleculares (PCR) en la cabra (*Capra hircus*), la llama (*Lama*

glama), la alpaca (*Vicugna pacos*), el ciervo de cola negra (*Odocoileus hemionus*), el gamo (*Dama dama*), el kudú (*Tragelaphus imberbis*), el ciervo de Eld (*Rucervus eldii*), el rinoceronte (*Ceratotherium simum*), aves, roedores y lagomorfos (Ferroglia et al. 2007; Costa et al. 2008; Barratt et al. 2008; Hughes et al. 2008 Fuehrer et al. 2010; Truppel et al. 2010; Gondim et al. 2010). Así mismo, se ha logrado la infección experimental en la cabra (*Capra aegagrus hircus*) (Nascimento Porto et al. 2016).

Los perros pueden infectarse de forma horizontal (por consumo de alimentos o agua de bebida contaminados con ooquistes esporulados o por consumo de tejidos del hospedador intermedario con quistes tisulares) o vertical (transplacentaria o lactogénica). Las mayores tasa de seroprevalencia se ha descrito en perros adultos y en perros de zonas rurales, por la mayor posibilidad de exposición al parásito con la edad. Sin embargo, la producción de ooquistes es mayor en cachorros que en animales adultos, posiblemente por la inmunidad protectora desarrollada tras exposiciones previas a *N. caninum* (Lindsay et al. 1999; Gondim et al. 2002; Gondim et al. 2005).

Se conocen dos formas de transmisión de *N. caninum* en el ganado bovino, la horizontal y la vertical. La transmisión horizontal, también denominada postnatal, tiene lugar mediante la ingestión de agua o alimento contaminado con ooquistes eliminados por el hospedador definitivo. Por su parte, la transmisión vertical o transplacentaria se produce cuando en una hembra gestante los taquizoítos atraviesan la placenta e invaden el feto. Los hospedadores intermediarios pueden infectarse al ingerir alimentos o agua contaminados con ooquistes eliminados por el perro. Igualmente, *N. caninum* puede transmitirse verticalmente a la descendencia por la vía transplacentaria. Se han propuesto los términos de transmisión transplacentaria endógena (TTEn) y exógena (TTEx) para describir con mayor precisión el origen de la infección en el feto (Trees and Williams, 2005). Así, la TTEx tiene lugar después de la primoinfección de la madre por la ingestión de ooquistes esporulados. La TTEn ocurre en animales persistentemente infectados después de la reactivación de la infección crónica durante la gestación (Trees and Williams, 2005). La TTEn es el principal modo de infección en el ganado bovino y parece jugar un papel relevante en la propagación y mantenimiento de la infección. Por último, la depredación de tejidos infectados con quistes de bradizoítos se presenta como la única vía de transmisión de la infección desde el hospedador intermediario al definitivo, cerrando de esta forma el ciclo biológico (Dubey y Schares, 2011).

Se ha demostrado la existencia de un ciclo silvestre, además del ciclo doméstico ya descrito (Gondim 2006), lo cuales están relacionados ya que es posible la transmisión del parásito de animales silvestres al perro y, posteriormente, de éste al ganado bovino, así como del ganado bovino a cánidos silvestres, y de éstos a los rumiantes silvestres (Gondim et al. 2004; Almeria et al. 2007). El hospedador intermediario mantiene el parásito en la naturaleza, tanto en el ciclo doméstico, como en el silvático y sirve como fuente de contagio para el hospedador definitivo (cánidos), manteniéndose infectado durante toda la vida (Almeria y López-Gatius 2013).

En Norteamérica se ha confirmado la transmisión de *N. caninum* entre ciervos de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y cánidos en un ciclo silvático (Gondim et al. 2004). Estos autores demostraron que perros alimentados con cerebros de ciervos de cola blanca infectados de manera natural, eliminaban ooquistes y, por tanto, eran capaces de cerrar el ciclo biológico, verificandose de esta forma la existencia del ciclo silvático. La existencia de un ciclo similar en Europa no ha sido descrita hasta la fecha. Los estudios realizados

en diferentes áreas de España han puesto de manifiesto la presencia de anticuerpos en ruminantes y carnívoros silvestres (Almería et al. 2007), demostrándose la presencia del parásito en la fauna silvestre en nuestro país.

2.4.2.a.3. Situación actual en los ruminantes domésticos

La infección por *N. caninum* puede producir aborto en los pequeños ruminantes (Masala et al. 2007; Moreno et al. 2012; González-Warleta et al. 2014) y es una de las principales causas de aborto en el ganado bovino (Dubey, 2003; Trees y Williams, 2005; Almería y López-Gátius, 2013), produciendo grandes pérdidas económicas.

Los abortos se suelen producir a partir de los 3 meses de gestación, pero la mayor parte de ellos se producen entre los 5-7 meses de gestación (López-Gátius et al. 2004; Dubey et al. 2007) y el riesgo de aborto se puede correlacionar con la seropositividad a *N. caninum* (Pabón et al. 2007). Parece ser que la susceptibilidad a la infección, y por tanto el riesgo de aborto, es menor en razas de carne que de leche y que las lesiones presentes en el cerebro de los fetos de razas de carne son menos extensas que en los fetos de razas de leche (De Meerschman et al. 2000; 2002). Incluso se recomienda el uso de semen de razas de carne en la inseminación de vacas de leche seropositivas para disminuir la tasa de abortos (López-Gátius et al. 2005). Tras la infección los fetos pueden morir *in utero* y ser reabsorbidos, o quedar retenidos y momificarse, y si no mueren los terneros pueden nacer vivos con signos clínicos o sin signos clínicos, pero persistentemente infectados. Se han descrito que infecciones concomitantes por virus pueden agravar los problemas e incrementar las pérdidas asociadas a la infección por este parásito (p. ej. IBR, Rinaldi et al. 2007; y BVDV, Duong et al. 2008).

Hay grandes diferencias en los valores de seroprevalencia de *N. caninum* descritos en el ganado bovino entre diferentes países, regiones e incluso entre el ganado lechero y de aptitud cárnica. Sin embargo, el diseño experimental de los estudios, los sistemas de producción, el tamaño muestral y las técnicas de diagnóstico utilizadas han sido muy variados y poco comparables (Dubey et al. 2007; Dubey y Schares 2011). Hay datos que respaldan que la seropositividad puede estar influenciada por la raza (Armengol et al. 2007; Duong et al. 2008; Munhoz et al. 2009). Sin embargo, un amplio estudio realizado en el noroeste de España encontró seroprevalencias muy similares en razas de aptitud lechera y cárnica (22,5% y 25,6%, respectivamente; Eiras et al. 2011).

El principal factor de riesgo de la infección por *N. caninum* es la presencia de perros en las explotaciones, que aumenta la posibilidad de infecciones postnatales por contaminación del alimento o el medio ambiente de la explotación. El riesgo aumenta si los perros tienen acceso a fetos o placentas de animales abortados (Dubey et al. 2007; VanLeeuwen et al. 2010).

2.4.2.a.4. Situación actual en ungulados silvestres

Cada vez hay más interés en estudiar el papel que juegan estos ruminantes silvestres en los ciclos silváticos de diferentes patógenos, entre ellos *N. caninum*.

La neosporosis clínica es rara en animales silvestres (Dubey 2003), si bien se ha descrito en ciervos, principalmente mantenidos en condiciones de cautividad. En estos casos la neosporosis se caracterizó por con la presencia de mortinatos y afectación

sistémica en animales muy jóvenes (Dubey et al. 2007). En los últimos años, se han realizado numerosas investigaciones sobre la presencia de la infección en animales silvestres. En la Tabla 3 se muestran los resultados del aislamiento y la detección de ADN del parásito en diferentes especies de cérvidos.

Tabla 3.: Aislamientos y detección del ADN de *N. caninum* en cérvidos.

Especie	País	Órgano	Metodología n° positivos	Referencia
Ciervo cola blanca (<i>Odocoileus virginianus</i>)	EE.UU.	Cerebro	Aislamiento 4 aislados	Gondim et al. 2004. Vianna et al. 2005
Ciervo de cola negra (<i>Odocoileus hemionus columbianus</i>)	EE.UU.	Pulmón y riñón	IHC o ADN 1 positivo	Woods et al. 1994.
Gamo (<i>Dama dama</i>)	Suiza	Cerebro	IHC o ADN 1 positivo	Soldati et al. 2004.
Eld's deer (<i>Cervus eldi siamensis</i>)	Francia	Cerebro	IHC 1 positivo	Dubey et al. 1996.
Corzo (<i>Roe deer</i>)	Bélgica	Cerebro	PCR 10% Positivo	de Craeye et al. 2011.
Ciervo rojo (<i>Cervus elaphus</i>)	Bélgica	Cerebro	PCR 0% Positivo	de Craeye et al. 2011.

- IHC: Inmunohistoquímica

Con relación a la presencia de anticuerpos, en los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones para determinar la seroprevalencia de la infección por *N. caninum* en la fauna silvestre. Desafortunadamente, no se pueden comparar los resultados de los diferentes estudios por el uso de técnicas diferentes y por la falta de validación de las mismas en las diferentes especies silvestres. Por tanto, los resultados se deberían interpretar con cautela, sobre todo cuando solo se ha utilizado una única prueba serológica (Gondim 2006; Dubey et al. 2007; Dubey y Schares 2011; Almeria y López-Gatius 2013). En la fauna silvestre las pruebas más comunmente utilizadas son el ELISA de competición y la aglutinación (Almeria y López-Gatius 2013), cuya principal limitación son los puntos de corte empleados dada la dificultad para disponer de adecuados sueros de referencia.

Se ha detectado seropositividad frente a *N. caninum* en multitud de especies, tanto en animales criados en libertad como en cautividad (Dubey y Schares 2011). En la Tabla 4 se muestran las prevalencias encontradas en las tres especies presentes en Quintos de Mora.

Así mismo, se detectaron seroprevalencias relativamente bajas en ungulados silvestres en diferentes países de Europa: 5,6% en la cabra montés (*Capra pyrenaica hispanica*) en España (García-Bocanegra et al. 2012); 3% en el muflón (*Ovis ammon*) en la República Checa (Bártová et al. 2007), 14% en el ciervo sika de Vietnam (*Cervus nippon pseudaxis*) en la República Checa (Bártová et al. 2007), 1% en el alce (*Alces alces*) en Suecia (Malmsten et al. 2011); 0,3% en el jabalí (*Sus scrofa*) en España (Almería et al. 2007) y 7,7% en el arruí (*Ammotragus lervia*) en España (Almería et al. 2007).

La situación en España, teniendo en cuenta la detección de anticuerpos específicos en el ciervo, el arruí, el corzo, la cabra y el jabalí, sugieren que los ciclos selvático y doméstico deben estar inter-conectados y podrían influenciar la prevalencia de *N. caninum* en el ganado bovino y los pequeños rumiantes (Panadero et al. 2010; García-Bocanegra et al. 2012; Almería et al. 2007).

Tabla 4.: Prevalencia de *N. caninum* en el gamo, el corzo y el ciervo rojo en Europa.

Especie	País	nº analizados	Prevalencia %	Referencia
Ciervo rojo	Italia	102	12.7	Ferroglio et al. 2001.
Ciervo rojo	Italia	125	3.2	Bregoli et al. 2006.
Ciervo rojo	España	237	11.8	Almeria et al. 2007.
Ciervo rojo	Bélgica	7	0	Stieve et al. 2010.
Ciervo rojo	España	131	2	San Miguel et al. 2016
Corzo	Italia	43	37.2	Ferroglio et al. 2001.
Corzo	Italia	117	3	Gaffuri et al. 2006.
Corzo	Italia	66	7.6	Bregoli et al. 2006.
Corzo	Bélgica	4	2.7	de Craeye et al. 2011.
Corzo	Rep- Checa		14	Bártová et al. 2007.
Corzo	España	160	13.7	Panadero et al. 2010.
Corzo	Bélgica	33	6.1	Almeria et al. 2007.
Gamo	España	79	0	Almeria et al. 2007.
Gamo	Bélgica	4	0	de Craeye et al. 2011.
Gamo	Rep- Checa	143	1.4	Bártová et al. 2007.
Gamo	Polonia	213	11-13	Gozdzik et al. 2010.
Gamo	Polonia	335	2.9	Bien' et al. 2012.

2.4.2.b. Toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial, producida por *Toxoplasma gondii*, protozoo intracelular que es capaz de infectar a prácticamente cualquier especie homeoterma, incluido el hombre. La toxoplasmosis es una de las principales zoonosis de transmisión alimentaria (Bojar y Szymanska 2010; Dubey y Beattie 1988). Su relevancia médica y veterinaria se descubrió en 1939 y 1957, respectivamente (Wolf et al. 1939; Hartley y Marshall 1957). Las repercusiones clínicas de la toxoplasmosis son diversas y de intensidad muy variable, en función de la especie animal, la edad y el estado inmunitario individual. La toxoplasmosis cursa habitualmente de forma subclínica en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, en el ganado ovino y caprino, la toxoplasmosis es una causa importante de abortos y mortalidad neonatal. En el hombre, las repercusiones más graves ocurren en mujeres embarazadas o personas inmunocomprometidas (Dubey y Beattie 1988). Tanto en los humanos como en los pequeños ruminantes la toxoplasmosis clínica se caracteriza por producir muerte fetal o el nacimiento de la descendencia congénitamente infectada y aparentemente sana o con malformaciones congénitas diversas.

2.4.2.b.1. Etiología

Toxoplasma gondii es un protozoo intracelular obligado perteneciente al subphylum Apicomplexa (Sin. Sporozoa), clase Coccidia, orden Eimeriida, familia Sarcocystidae y subfamilia Toxoplasmatinae, tal y como se ha mencionado previamente en el caso de *N. caninum* (Levine 1977).

2.4.2.b.2. Ciclo biológico y transmisión

El ciclo biológico de *T. gondii* es heteroxeno facultativo, interviniendo un hospedador definitivo y otro intermediario, donde tienen lugar la reproducción sexual y asexual del parásito respectivamente. Al igual que lo descrito para *N. caninum*, se conocen tres estadios parasitarios: el taquizoito (estadio de multiplicación rápida); el bradizoito (estadio de multiplicación lenta) dentro de quistes tisulares localizados en el SNC y el tejido muscular en el hospedador intermediario; y el esporozoíto en el interior de los ooquistes que son eliminados con las heces al medio ambiente por el hospedador definitivo (Dubey and Frenkel 1973; Dubey and Beattie 1988; Dubey 1997; Dubey et al. 1997).

El hospedador definitivo es el gato doméstico (*Felis catus*) (Frenkel et al. 1970) y otros felinos salvajes (Tenter et al. 2000), los cuales a su vez también pueden ser hospedadores intermediarios. La infección transplacentaria en gatos domésticos puede ocurrir, pero no es usual (Dubey y Carpenter 1993). La mayoría de los gatos se infectan después del nacimiento por la ingestión de tejidos infectados con quistes tisulares o por el consumo de alimento o agua de bebida contaminados con ooquistes esporulados. La transmisión es más eficiente mediante la ingestión de tejidos infectados (Dubey 2001, 2006). Aunque se pueden reinfectar, los gatos normalmente eliminan ooquistes en una sola ocasión durante su vida, durante alrededor de una semana (Davis y Dubey 1995, 2004).

Como hospedadores intermediarios pueden actuar un abanico muy amplio de animales homeotermos, incluido el hombre. Destacan el cerdo, diferentes especies de aves domésticas, la vaca, la oveja, la cabra, como especies domésticas, y los roedores (Dreesen 1990), aves silvestres (Peach et al. 1989), el ciervo, el oso y el mapache (*Procyon lotor*) (Dubey y Jones 2008), como especies silvestres más relevantes. Los hospedadores intermediarios se infectan, fundamentalmente, por el consumo de ooquistes esporulados y en función de la dieta, por el consumo de quistes presentes en los tejidos de otros hospedadores intermediarios. La transmisión transplacentaria que tiene lugar tras una primoinfección es la responsable del fallo reproductivo en los humanos y los pequeños rumiantes, si bien en el ganado caprino se han descrito abortos repetidos por la infección por *T. gondii*.

En el entorno silvestre, la infección es frecuente en las aves silvestres y en los roedores y, en el entorno doméstico, en el ganado ovino, caprino y porcino. Se piensa que los ciclos biológicos silvático y doméstico de este parásito están interconectados debido a las elevadas tasas de seroprevalencia descritas en los carnívoros silvestres y las diferentes especies de animales silvestres (Millán et al. 2009; Sobrino et al. 2010) atribuidas a la contaminación ambiental con ooquistes eliminados por felinos silvestres o domésticos. En el caso de la toxoplasmosis humana la principal fuente de la infección es el consumo de carne poco cocinada del ganado porcino y, en menor medida, de pequeños rumiantes y especies cinegéticas. También se han descrito casos de transmisión hídrica o por consumo de verduras contaminadas con ooquistes e incluso la inhalación de ooquistes en ambientes muy contaminados (Jones et al. 2012).

Se han detectado ooquistes en heces de gatos, en el pienso, en el suelo y en muestras de agua en granjas, por lo que la transmisión de *T. gondii* es frecuente en zonas rurales (Dubey et al. 1995; Weigel et al. 1999).

2.4.2.b.3. Situación actual en los rumiantes domésticos

Toxoplasma gondii es una de las principales causas de fallo reproductivo y mortalidad neonatal en los pequeños rumiantes en todo el mundo (Dubey y Kirk-bridge 1989a; Masala et al. 2007). Los corderos infectados congénitamente y que sobreviven pueden ser una fuente de infección para el hombre (Dubey y Kirk-bridge 1989b). La prevalencia de *T. gondii* en corderos es elevada en EE.UU. y se han descrito prevalencias entre el 24% y el 73,8 % (Dubey y Jones 2008).

Igualmente en España, la infección por *T. gondii* está muy extendida en los pequeños rumiantes. Se han descrito tasas de prevalencias del 46,1 % y 54,5 % en ovejas y cabras en el norte del país, respectivamente (Ortega-Mora et al. 2006). Así mismo, la infección por *T. gondii* fue detectada en el 23,1% de los fetos ovinos abortados (Pereira-Bueno et al. 2004). Por su parte, García-Bocanegra et al. (2013) han descrito tasas de prevalencia del 49,3 % en ovejas y del 25,1 en cabras en el sur de España.

La infección por *T. gondii* no es frecuente en el ganado bovino, en el cual tras el consumo de ooquistes apenas se detecta el parásito, posiblemente debido al desarrollo de una respuesta inmune innata eficaz (Dubey 1983; 1986). De hecho, se han descritos tasas de seroprevalencia de la infección en el ganado bovino en EE.UU. que oscilaron entre el 3,2 y el 0 % (Dubey 1985; Dubey et al. 2005), contrastando con el estudio realizado por García-Bocanegra et al. (2013) donde se describió una prevalencia del 83,3 % en el sur de España, posiblemente asociadas a la técnica comercial ELISA utilizada.

2.4.2.b.4. Situación actual en ungulados silvestres

Este protozoo parásito requiere más atención que *Neospora*, ya que es una de las zoonosis de transmisión alimentaria más importantes. Se estima que más de un tercio de la población mundial podría estar infectada. De hecho se considera un ejemplo perfecto de patógeno compartido por el hombre, los animales domésticos y la fauna silvestre dentro del concepto “Una única sanidad” (Jenkins et al. 2015).

Se conoce muy poco sobre las manifestaciones clínicas y las lesiones ocasionadas por *T. gondii* en los animales silvestres. Se han descrito casos clínicos en diversas especies entre las que también se encuentran los rumiantes silvestres, como el ciervo de cola blanca (Dubey et al. 2008).

Se han detectado anticuerpos frente a *Toxoplasma* en una gran variedad de especies (mamíferos terrestres y marinos y aves), en diversas regiones estudiadas, incluida la región Ártica (Thompson 2013). En Europa se han realizado diferentes estudios de seroprevalencia de *T. gondii* en rumiantes silvestres (Tabla 5), con resultados muy variables, así como en España (Tabla 6).

Tabla 5.: Prevalencia de *T. gondii* en rumiantes silvestres en Europa.

Especie	País	nº analizados	Prevalencia %	Referencia
Gamo	Bélgica	4	0	de Craeye et al. 2011.
Gamo	Rep. Checa	143	17	Bártová et al. 2007.
Corzo	Bélgica	73	52	de Craeye et al. 2011.
Corzo	Rep. Checa	79	24	Bártová et al. 2007.
Corzo	Italia	207	13	Gaffuri et al. 2006.
Muflón	Rep. Checa	105	9	Bártová et al. 2007.
Ciervo rojo	Bélgica	7	0	de Craeye et al. 2011.
Ciervo rojo	Rep. Checa	377	45	Bártová et al. 2007.
Rebeco (<i>Rupicapra rupicapra</i>)	Italia	236	5	Gaffuri et al. 2006.
Ciervo Sika de Vietnam (<i>Cervus nippon pseudaxis</i>)	Rep. Checa	14	14	Bártová et al. 2007.

Tabla 6.: Prevalencia de *T. gondii* en rumiantes silvestres en España.

Especie	nº analizados	Prevalencia %	Referencia
Gamo	79	24	Gauss et al. 2006.
Muflón	27	14.8	Gauss et al. 2006.
Ciervo	441	15.6	Gauss et al. 2006.
Corzo	33	21.8	Gauss et al. 2006.
Corzo	278	39.2	Gamarra et al. 2008.
Rebeco	10	20	Gauss et al. 2006.
Arruí	10	10	Gauss et al. 2006.
Cabra montés	3	33.3	Gauss et al. 2006.
Cabra montés	531	27.5	García-Bocanegra et al. 2012.

A medida que se caracterizan genéticamente los diferentes aislados procedentes de la fauna silvestre se pone en evidencia la gran diversidad genética de *Toxoplasma* en y la aparición de nuevos genotipos que difieren de las cepas "estándar" (Thompson 2013). Esta variabilidad genética se debe posiblemente a la frecuente recombinación genética que tiene lugar tras la reproducción sexual del parásito en el hospedador definitivo. De hecho, el gato y los felinos silvestres son la fuente de contaminación de *Toxoplasma* en el medio ambiente. Por tanto, los felinos silvestres juegan un papel clave en el ciclo silvático de *T. gondii*.

2.4.3. Enfermedades bacterianas

2.4.3.a. Leptospirosis

La leptospirosis es una zoonosis bacteriana de amplia distribución a nivel mundial, a pesar de que los seres humanos no son hospedadores de mantenimiento de ninguna serovariedad y aunque presenta grandes diferencias entre países. Así, tradicionalmente está relacionada con regiones que tienen ciertas características socioeconómicas y climáticas que favorecen que la infección sea endémica en reservorios animales, tanto domésticos como silvestres, y que los seres humanos tengan una mayor exposición a las fuentes de infección (Pappas et al. 2008). En países desarrollados los casos suelen ser importados tras viajes a otros países, asociados a deportes recreativos acuáticos y ligados a la actividad profesional (veterinarios, trabajadores de mataderos, ganaderos, cazadores o profesiones en contacto con lugares contaminados como redes de alcantarillado, arrozales, minas, etc.).

Algunas estimaciones indican que anualmente hay más de 500.000 casos de leptospirosis en el mundo, con una mortalidad mayor del 10% (WHO/OMS 2010). La leptospirosis está entre los 10 primeros eventos de naturaleza infecciosa reportados en el EMS (Sistema de Manejo de Eventos), confirmándose así la importancia de esta enfermedad en la salud pública (WHO/OMS 2011).

En nuestro país, hay pocos datos sobre el verdadero impacto de la leptospirosis. Pappas et al. (2008) reportaron una incidencia de 0,7 casos por millón de habitantes.

Posteriormente, Domingo et al. (2016) describieron una incidencia acumulada de 3,43 casos por millón de habitantes entre 2009 y 2012, con una incidencia media anual de 0,86 casos por millón de habitantes, siendo las CC.AA. de Extremadura, Ceuta, Canarias y Asturias las de mayor incidencia y Canarias y el País Vasco las que tuvieron un mayor número de casos. La tasa de mortalidad fue del 6,3 %.

2.4.3.a.1. Etiología

El género *Leptospira* está formado por bacterias Gram negativas con forma helicoidal, con gran movilidad, pequeño diámetro, bastante longitud y ambos extremos tienen forma de gancho. Estas bacterias pertenecen a la familia Leptospiraceae, segunda familia del orden Spirochaetales (Canale-Parola, 1984) y se les reconoce como único género dentro de dicha familia. Hasta 1989, estas bacterias se clasificaban en dos únicas especies: *Leptospira biflexa* y *Leptospira interrogans*. La primera incluía todas las cepas saprofitas o de vida libre, mientras que la segunda agrupaba todas las cepas patógenas (Levett 2001). Posteriormente, utilizando técnicas de hibridación ADN-ADN, estas dos especies se han separado en 22 genomoespecies, de las cuales 10 son patógenas, 5 son potencialmente patógenas o intermedias y 7 son saprófitas (Adler y de la Peña Moctezuma 2010). Repartidas entre estas 22 genomoespecies se encuentran las más de 300 serovariedades descritas hasta este momento (Victoriano et al. 2009). La serovariedad es el taxón básico y se define en base a similitudes y diferencias antigénicas detectadas por pruebas serológicas. Las más de 300 serovariedades se han agrupado en 24 serogrupos, incluyendo cada serogrupo aquellas que presentan antígenos comunes y se cruzan serológicamente hasta un determinado grado (Marquez et al. 2017).

2.4.3.a.2. Transmisión

La leptospirosis afecta a todos los mamíferos tanto domésticos como silvestres, habiéndose aislado estas bacterias también de otros vertebrados. Se ha descrito en todas las regiones excepto en las zonas polares (Ellis 2015). Una o varias especies animales actuarán como reservorio continuo de una serovariedad en una región o ecosistema determinado. Estas especies se denominan hospedadores de mantenimiento y asegurarán la perpetuación de esa serovariedad sin la intervención de otras especies animales, siendo la principal fuente de infección para otros individuos de esta u otra especie. El resto de las especies animales de dicho ecosistema podrán infectarse por esta serovariedad esporádicamente y, por ello, se les denominará hospedadores accidentales, ya que dicha serovariedad no está adaptada a esas especies (Hathaway 1981). Las características de la infección por serovariedades adaptadas y accidentales se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7.: Características de la infección por serovariedades adaptadas y accidentales de *Leptospira* spp.

Aspecto	Serovariedad adaptada	Serovariedad accidental
Transmisión	Intraespecífica	Interespecífica
Susceptibilidad	Alta	Baja
Patogenicidad	Baja	Alta
Formas clínicas	Crónica (trastornos reproductivos)	Aguda en animales jóvenes (crisis hemolíticas) y abortos
Leptospiruria	Intensa y muy prolongada	Días a semanas
Persistencia genital	Sí, en algunos casos (Ganado porcino: serovariedades Bratislava y Muenchen) (Ganado vacuno: serovariedad Hardjo)	No
Presentación	Endémica	Esporádica
% de población seropositiva	Alta y aumenta con la edad	Baja
Respuesta inmune	Títulos de anticuerpos bajos	Títulos de anticuerpos altos
Diagnóstico	Difícil y a nivel de rebaño	Sencillo y posible a nivel individual
Eficacia de la vacunación	Relativamente poco eficaz para prevenir infección	Muy eficaz para prevenir la infección

El modo más frecuente de transmisión en el caso de serovares adaptados (p. ej. Hardjo), es la transmisión horizontal directa, mientras que la transmisión horizontal indirecta tiene un papel más importante en las infecciones accidentales y se produce tras la exposición del animal a un ambiente contaminado con material infectante (Ellis 1994). La transmisión por contacto directo puede producirse de diversas maneras, siendo una de las más importantes la entrada de *Leptospira* spp. por vía inhalatoria o conjuntival, procedentes de núcleos goticulares formados por la dispersión de la orina de animales infectados. Esto es debido a que los hospedadores de mantenimiento de un determinado serovar eliminan gran cantidad de microorganismos en su orina durante un periodo de tiempo prolongado, por lo que las gotículas de orina tendrán una alta concentración de gérmenes. Este hecho, unido a la alta receptividad de los hospedadores de mantenimiento a la infección por el serovar adaptado, facilita su transmisión.

Además de lo anteriormente descrito, se ha demostrado la existencia de una transmisión vertical, tanto por vía transplacentaria como por vía galactófora (Amatredjo y Campbell 1975).

2.4.3.a.3. Situación actual en los rumiantes domésticos

El ganado vacuno es un hospedador de mantenimiento de la serovariedad Hardjo, pero hay grandes diferencias en su prevalencia entre países y regiones geográficas. Así, se han descrito seroprevalencias elevadas del 89,1 % en el Reino Unido (Pritchard 1986), 40,6 % en Australia (Milner et al. 1980) y 31,1 % en Brasil (De Almeida et al. 1988), frente a una baja prevalencia del 1,25% en Alemania (Schonberg et al. 1986). Entre las

serovariedades accidentales, los principales serogrupos implicados son Pomona, Icterohaemorrhagiae y Grippotyphosa.

Aunque la mayoría de las infecciones son subclínicas, en ocasiones pueden producirse abortos, mortinatos o el nacimiento de animales débiles y casos de agalaxia severa en las vacas en lactación. También se han descrito casos de infertilidad asociados a la serovariedad Hardjo, debido a su capacidad para colonizar y persistir en el aparato genital (Ellis 1994). Por último, las infecciones por serovariedades accidentales pueden dar lugar a fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia y muerte en animales jóvenes.

Los estudios más recientes de seroprevalencia realizados en España se recogen en la Tabla 8. La serovariedad Hardjo presenta una baja prevalencia en nuestro país, siendo la serovariedad Bratislava la de mayor prevalencia en todos los estudios, habiéndose además asociado esta serovariedad con abortos en el ganado vacuno en el norte de España (Atxaerandio et al. 2005). La serovariedad Pomona presenta una mayor prevalencia en la zona sur de España y se ha aislado a partir de ganado vacuno en diferentes brotes caracterizados por la caída de leche, abortos y/o un cuadro agudo grave con fiebre, ictericia, hemorragias, hemoglobinuria y mortalidad en animales jóvenes (García Peña et al. 2011; Arent et al. 2017).

Tabla 8.: Prevalencia de las serovariedades más importantes en ganado vacuno en España.

Región	Año	Seroprevalencia frente a serovariedad						Referencia
		Hardjo		Bratislava		Pomona		
		Ind	Reb	Ind	Reb	Ind	Reb	
Asturias	93/94	0,75%	-	-	-	5,6%	-	Espi et al. 2000.
Galicia	96/97	0,9%	-	7,92%	-	1,13 %	-	Guitián et al. 2001.
País Vasco	98/99	8,2%	-	25,94%	-	7,7%	-	Atxaerandio et al. 2001.
Castilla-León	2000	1,7%	10,7%	3,6%	24,2%	0,4%	2,8%	Alonso et al. 2001.
Asturias	2001	-	-	31,25%	-	-	-	Espi et al. 2001.
España	96/01	4,1%	13,7%	10,9%	47,7%	4,2%	9,6%	García Peña et al. 2011.
Norte		1,5%	10,2%	10,7%	48,1%	1%	5,2%	
Sur		8,8%	19,8%	13,9%	46%	16%	34%	
Este		11,4%	26,4%	5%	46,1%	3,1%	23,1%	

- Ind: Individual; Reb: Rebaño.

El ganado ovino se ha considerado relativamente resistente a la infección debido a que gran parte de los estudios detectaron bajas tasas de seroprevalencia y solo un escaso número de serogrupos ocasionaron brotes clínicos. Sin embargo, posteriormente, se ha demostrado que el ganado ovino puede actuar como un hospedador de mantenimiento

alternativo de la serovariedad Hardjo (Gerritsen et al. 1994) e incluso se ha demostrado su persistencia en el aparato genital (Arent et al. 2013). El cuadro clínico es similar a lo anteriormente descrito para el ganado vacuno y al igual que en esta especie hay grandes diferencias regionales en la prevalencia. Así, en un estudio realizado en Nueva Zelanda, la prevalencia fue del 43,6 % para la serovariedad Hardjo y del 14,1 % para la serovariedad Pomona (Dreyfus et al. 2018). Sin embargo, en un estudio realizado en Brasil la prevalencia fue del 3% y, únicamente, frente a la serovariedad Hardjo (Seixas et al. 2011). Asimismo, en Italia la prevalencia total fue del 5,6 %, siendo Hardjo la de mayor prevalencia con un 3,4 % (Tagliabue et al. 2016).

En nuestro país, el principal estudio en pequeños rumiantes fue el realizado por León-Vizcaino et al. (1987) que investigaron la etiología de 973 brotes de abortos en el ganado ovino y de 262 brotes en el ganado caprino ocurridos durante el periodo 1970-1985. La infección por *Leptospira* spp. se asoció al 1,7 % y al 2,6 % de los brotes, respectivamente, estando implicadas las serovariedades Pomona (11 brotes en ovino y 6 en cabras), Sejroe (3 brotes en ovino y 1 en caprino), Icterohaemorrhagiae (2 y 1, respectivamente) y Grippotyphosa (1 brote en ovino).

2.4.3.a.4. Situación actual en ungulados silvestres

Entre los animales silvestres, los roedores y el jabalí se consideran los reservorios más importantes de *Leptospira* spp. patógenas (Bharti et al. 2003). La principal fuente de infección para ungulados silvestres es, por tanto, el contacto con agua y pastos contaminados con orina de animales portadores de dichas especies.

En estudios realizados en Nueva Zelanda, el ciervo rojo explotado en granjas se considera hospedador de mantenimiento de la serovariedad Hardjo, hospedador accidental a nivel individual y de mantenimiento a nivel de población de la serovariedad Pomona y hospedador accidental de la serovariedad Copenhageni (Ayanegui-Alcerreca 2007). Sin embargo, es posible que en la fauna silvestre estas relaciones entre tipo de hospedador y serovariedad sean diferentes.

Las infecciones por la serovariedad Hardjo son normalmente subclínicas (Subharat et al. 2011), aunque pueden producir pérdidas de animales antes el destete y una pobre ganancia de peso. La serovariedad Pomona ha estado implicada en un caso de enfermedad hemolítica aguda en el ciervo rojo (Ayanegui Alcérreca, 2007), el ciervo mula (Rapley et al. 1981) y el ciervo de cola blanca (Ferris et al. 1960).

En las diferentes especies de ciervos, de 66 trabajos publicados entre los años 1957 y 2005 (45 de cérvidos silvestres, 16 de ciervos en cautividad, 4 de infecciones experimentales en ciervos en cautividad y 2 de cérvidos en zoos), se concluye que la serovariedad más prevalente es Pomona, seguida de Hardjo, Copenhageni, Grippotyphosa y Ballum. Sin embargo, solo las serovariedades Pomona, Hardjobovis, Copenhageni y Roumanica se han aislado a partir de cérvidos (Ayanegui Alcérreca 2006). Estudios más recientes han demostrado la posible importancia de otras serovariedades. Así, en EE.UU., la seroprevalencia observada en el ciervo de cola blanca fue del 44,8 %, siendo la serovariedad Bratislava (37,1%) la más frecuente, seguida de Pomona (8,5 %), Grippotyphosa (6,1 %), Hardjo (3,4 %), Canicola (2,9 %) e Icterohaemorrhagiae (2,4 %) (Pedersen et al. 2018).

En España, son escasos los estudios realizados sobre leptospirosis en ungulados silvestres. Espí et al. (2010) reportaron en Asturias seroprevalencias en el ciervo rojo ibérico del 2,6 % para la serovariedad Muenchen, 1,6 % para Pomona, 1,2 % para Panama, 1,1 % para Bratislava, 0,7 % para Grippotyphosa y 0,4 % para Pyrogenes, no detectándose positivos frente a las serovariedades Copenhageni e Icterohaemorrhagiae. En el gamo común la serovariedad Pomona fue la más seroprevalente (5,8 %), seguida de Grippotyphosa y Pyrogenes (2,4 %), Panama (1,7 %), Bratislava 0,7 %) y Copenhageni (0,6 %). Por último, las seroprevalencias observadas en jabalí fueron del 5,2 % para la serovariedad Pomona, 4,7 % para Bratislava, 1,7 % para Grippotyphosa, 1,2 % para Pyrogenes y 0,6 % para las serovariedades Autumnalis, Copenhageni e Icterohaemorrhagiae. En otro estudio anterior, Vicente et al. (2002) encontraron una seroprevalencia del 12 % frente a la serovariedad Pomona en poblaciones de jabalí de los montes de Toledo y Sierra Morena, pero utilizando un punto de corte de 1:400 en la prueba de microaglutinación frente al 1:80 utilizado por Espí et al. (2010). Por último, en el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete se analizaron 307 sueros de jabalí y la seroprevalencia frente al serogrupo Pomona fue del 17,6 %, pero con una elevada proporción de los sueros con título mayor de 1/1000, lo que supone que muchos de estos animales habrían estado excretando *Leptospira* spp. de este serogrupo hasta el momento del muestreo (García Peña et al. 2011). Estos estudios muestran la importancia del jabalí como fuente de infección, principalmente del serogrupo Pomona, para otras especies animales tanto domésticas como silvestres.

2.4.3.b. Fiebre Q

La Fiebre Q es una zoonosis con una distribución mundial, exceptuando, Nueva Zelanda y la Polinesia Francesa (Maurin y Raoult 1999; Musso et al. 2014) y está considerada como una zoonosis reemergente en muchos países. Está causada por la bacteria *Coxiella burnetii* que es un patógeno multi-hospedador. El nombre de Q fever o fiebre Q se ha adoptado en medicina veterinaria, aunque proviene de “query fever”, término que hace referencia a un proceso febril que se originó en trabajadores de un matadero de Australia, a pesar de que las implicaciones clínicas en animales son totalmente diferentes (Derrick 1937). Se ha mantenido este término, aunque sería más apropiado el término coxiellosis. Como la fiebre Q no es normalmente una enfermedad de declaración obligatoria, y como el curso clínico de la enfermedad es generalmente asintomático o con fiebre moderada, que desaparece espontáneamente, se desconoce la incidencia de fiebre Q en humanos en la mayoría de los países. A pesar de ello, los últimos estudios epidemiológicos realizados (Maurin y Raoult 1999) consideran que debe ser considerada como un problema de salud pública en muchos países, incluidos Francia, Inglaterra, Italia, España, Alemania, Israel, Grecia y Canadá.

La infección por *C. burnetii* en humanos se caracteriza por un cuadro clínico de gravedad leve o incluso es asintomática normalmente, pero pueden existir complicaciones y puede producirse la muerte en casos de meningoencefalitis o miocarditis. Así mismo, se han descrito casos de endocarditis en personas inmunodeprimidas o con daños previos en válvulas cardíacas o abortos o mortinatos en mujeres embarazadas (Angelakis y Raoult 2010). En los Países Bajos desde 2007 es considerada un problema de salud pública, con 2357 casos notificados en humanos en 2009. El estudio epidemiológico asoció el problema a brotes de abortos en rebaños de cabras (van der Hoek et al. 2010).

En pequeños rumiantes la infección por *C. burnetii* origina problemas reproductivos, principalmente abortos, mortinatos, nacimiento de animales no viables, metritis e infertilidad. Por tanto, la fiebre Q es un problema tanto sanitario, como económico, principalmente en el ganado ovino y caprino (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005). En el ganado bovino se asocia a veces con abortos esporádicos, infertilidad, metritis y/o mamitis y también con neumonía, y los terneros recién nacidos pueden estar débiles y padecer diarrea y problemas respiratorios, aunque lo más frecuente es que la infección sea asintomática (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Agerholm 2013; González-Barrio et al. 2015).

2.4.3.b.1. Etiología

La fiebre Q está producida por la infección con una bacteria intracelular obligada, Gram negativa (0.2–0.4 μm ancho y 0.4–1 μm longitud) de la Clase Gammaproteobacteria, Orden Legionellales, Familia Coxiellaceae, *C. burnetii* (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Agerholm 2013; González-Barrio et al. 2015). *Coxiella burnetii* es un patógeno multi-hospedador considerado como un agente zoonótico reemergente en muchos países. Posee dos formas antigénicas, conocidas como fase I, que es muy contagiosa y patógena, y fase II, que es inocua. Crece exclusivamente en fagolisosomas de células eucariotas y es capaz de formar esporas, lo cual le permite sobrevivir mucho tiempo en ambientes adversos, como por ejemplo el suelo (González-Barrio y Ruiz-Fons 2019).

2.4.3.b.2. Transmisión

Se pueden diferenciar tres tipos de reservorios de *C. burnetii*: los animales domésticos o peridomésticos, constituidos principalmente por el ganado caprino, ovino y bovino, y en menor medida gatos y perros; un segundo reservorio estaría formado por animales silvestres, principalmente roedores y pequeños mamíferos, aunque también ocasionalmente aves, reptiles, anfibios y peces; finalmente, varios tipos de garrapatas constituyen un importante reservorio de este agente patógeno. *Coxiella* se mantiene en la naturaleza a través de dos ciclos, el ciclo doméstico en el que intervienen los rumiantes domésticos y los animales de compañía, y el ciclo silvático en el que están implicados los animales silvestres y las garrapatas. La confluencia, cada vez más estrecha, entre ambos ciclos ha favorecido la reemergencia de la fiebre Q en humanos (Pérez-Arellano et al. 2018).

El hombre se infecta a través de aerosoles o polvo que contienen la bacteria, eliminada previamente por los animales (Tissot-Dupont et al. 1999, 2004). También se han descrito infecciones a partir de productos lácteos, aunque esta vía no es importante (Benson et al. 1963; Fishbein y Raoult 1992), y la posibilidad de transmisión vertical y sexual (Kruszewska y Tylewska-Wierzba-nowska 1997; Milazzo et al. 2001). El ganado doméstico, principalmente ovino, caprino y en menor medida bovino, se consideran la principal fuente de infección para el hombre. *Coxiella burnetii* se puede eliminar en el moco vaginal, leche, heces (Berri et al. 2002; Guatteo et al. 2007), orina (Heinzen et al. 1999), lana, placenta (Tissot-Dupont et al. 1992) y semen de los rumiantes (Kruszewska y Tylewska-Wierzbanowska 1997; García-Seco et al. 2016). Además, *C. burnetii* se puede aislar de sangre, pulmones, hígado, bazo, glándula mamaria de los animales

domésticos infectados, dependiendo de la cronicidad de la infección (Kim et al. 2005). *Coxiella burnetii* es muy resistente en el medio ambiente y puede sobrevivir semanas en zonas en las que ha estado presente el ganado, incluso puede ser diseminada mediante el viento (Marrie y Raoult 1997; Tissot-Dupont et al. 1999). Aunque *C. burnetii* se ha aislado de artrópodos, generalmente garrapatas, la transmisión por artrópodos es poco frecuente (Beaman y Hung 1989; Elkund et al. 1947).

La fiebre Q, por tanto, es principalmente una enfermedad ocupacional, que afecta en mayor medida a personas en contacto con el ganado ovino, caprino y bovino. Las personas de mayor riesgo son ganaderos, veterinarios, personal de mataderos o en contacto con productos lácteos y personal de laboratorio que trabajan con *C. burnetii*. Se han descrito casos esporádicos en personas con contacto ocasional con animales domésticos o con gatos o perros infectados.

2.4.3.b.3. Situación actual en los ruminantes domésticos

La infección por *C. burnetii* se produce en los ruminantes domésticos, principalmente el ganado ovino, caprino y bovino, en casi todo el mundo (Gautteo et al. 2011).

En el ganado bovino, la seroprevalencia de rebaño varía entre el 10,8 % y el 84% y la seroprevalencia intra-rebaño entre el 0 y el 45 % (Czaplicki et al. 2009; Khalili y Sakhaee 2009; Scolamacchia et al. 2010; McCaughey et al. 2010; Ruiz-Fons et al. 2010). Como resumen, en el ganado bovino no hay ninguna evidencia que muestre relación entre la infección por *C. burnetii* y el fallo reproductivo asociado a una disminución de las tasas de concepción, subfertilidad/infertilidad, esterilidad, retención de placenta o metritis/endometritis a nivel individual o de explotación (Agerholm 2013). De hecho, García-Ispierto et al. (2013) demostraron que las vacas infectadas y que eliminaban *C. burnetii* tenían mejores índices reproductivos que las vacas no infectadas.

La infección crónica por *C. burnetii* puede causar abortos, mortinatos, nacimiento de animales no viables en ovino y caprino (Lang et al. 1990; Rousset et al. 2010), pero las consecuencias en bovino han sido inconsistentes hasta el momento, e incluso se carece de revisiones en profundidad sobre las implicaciones en cada especie (Agerholm 2013; García-Ispierto et al. 2014). Hay datos sobre diferencias entre las especies con relación al impacto en reproducción y recientes estudios moleculares han demostrado que hay diferencias entre cepas de *C. burnetii* y que las cepas están asociadas con diferentes hospedadores, aunque la infección cruzada exista (Arricau-Bouvery et al. 2006; Santos et al. 2012).

La relación entre la infección por *C. burnetii* y el fallo reproductivo si ha sido demostrada tanto a nivel esporádico, como epidémico en el ganado ovino y caprino (Agerholm 2013). En el ganado ovino, la bacteria está presente en los cinco continentes, la seroprevalencia de rebaño varía entre el 0 % y el 89%, la seroprevalencia individual entre el 0 y el 62,5 % y la seroprevalencia intra-rebaño entre el 6,2 y el 94 % (Gautteo et al. 2011).

En caprino no se ha realizado ningún estudio en Oceanía, por lo que se ha demostrado la presencia en los otros 4 continentes. La seroprevalencia de rebaño varía entre el 0 % y el 100% y la seroprevalencia individual entre el 0 y el 75 %. Con relación a la seroprevalencia intra-rebaño sólo hay dos estudios que describen tasas de prevalencia

del 23 % y del 30,8 % (Guatteo et al. 2011). Numerosos estudios han sugerido la relación entre brotes de fiebre Q en cabras y en humanos (Delsing et al. 2008; Schimmer et al. 2008; Rousset et al. 2009; Klaassen et al. 2009). De hecho, en muchos países el ganado caprino es la principal fuente de infección para el hombre (Berri et al. 2007). En el País Vasco también se ha confirmado que el ganado ovino es una importante fuente de infección para el hombre. García-Pérez et al. (2009) correlacionaron la presencia del ADN bacteriano en tanque de leche con la seroprevalencia. La seroprevalencia era superior en animales adultos y las explotaciones con historial de abortos tenían seroprevalencias mayores. Las explotaciones con seroprevalencias por encima del 30 % tenían mayor probabilidad de tener un resultado de PCR positivo en tanque de leche, aunque en el estudio se observaron explotaciones con baja seroprevalencia intra-rebaño y con resultado de PCR positivo en el tanque de leche.

2.4.3.b.4. Situación actual en ungulados silvestres

Aunque multitud de animales silvestres pueden actuar como reservorios de *C. burnetii*, éstos no son imprescindibles para que la circulación de la bacteria en muchas ocasiones quede restringida al ciclo doméstico en animales de abasto (Little 1983). Numerosas especies de mamíferos y aves son hospedadores de la bacteria (Hirai y To 1998, Astobiza et al. 2011; Ruiz-Fons et al. 2008; González-Barrio et al. 2015, Candela et al. 2017) e incluso se han descrito casos de transmisión al hombre a partir de animales silvestres (Syrucsek y Raska 1956; Hirai y To 1998). Sin embargo, Porter et al. (2011) consideran que la fauna silvestre tiene una escasa importancia en la epidemiología de la fiebre Q. En un estudio reciente se detectó *C. burnetii* en 109 de un total de 167 especies analizadas (63,5%) incluidas en 12 Ordenes de mamíferos silvestres. Además, en 50 de las 167 (29,9%) especies se confirmó la presencia de la bacteria mediante aislamiento o PCR (González-Barrio y Ruiz-Fons 2018).

Las herramientas serológicas empleadas para detectar la exposición a *C. burnetii* son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la fijación del complemento y el ensayo de inmunodifusión (ELISA) (Herremans et al. 2013). Tanto la prueba ELISA como la fijación del complemento se usan ampliamente en animales, mientras que la IFI se usa principalmente en medicina humana. La prueba ELISA es la más usada para estudios epidemiológicos en poblaciones de fauna silvestre. Actualmente hay varias pruebas ELISA comerciales para detectar anticuerpos frente a *C. burnetii* en ruminantes domésticos y también en especies silvestres, una vez validadas (González-Barrio et al. 2015). La validación de herramientas serológicas para la fauna silvestre puede ser difícil debido a la falta de sueros testigo apropiados.

Se han descrito valores variables de prevalencia en EE.UU. en el ciervo de cola blanca que oscilaron entre 0 y 32 % dependiendo de las zonas del Estado de New York muestreadas (Kirchgesner et al. 2013).

Diferentes estudios de seroprevalencia realizados en el ciervo rojo en España describieron prevalencias bajas del 9,5%, 3,8% y 0% en zonas del norte, centro y sur, respectivamente (Ruiz-Fons et al. 2008; González-Barrio et al. 2015). Otros estudios realizados en Europa han descrito seroprevalencias del 25% en el ciervo en la República Checa (Hubálek et al. 1993).

Sin embargo, en un estudio realizado en una granja de ciervos, tras un caso de fiebre Q en una persona (González-Barrio et al. 2015), se encontraron seroprevalencias del 36 % en ciervas, de las cuales el 50 % había tenido problemas reproductivos. Asimismo, se detectó ADN de *C. burnetti* en el 40 % de las torundas vaginales de hembras con problemas reproductivos y en el 15,4 % de las que no habían tenido problemas reproductivos. Se concluyó, tras descartar otros patógenos, que el fallo reproductivo estaba asociado a la infección por *C. burnetti*, detectándose DNA de *C. burnetii* en torundas vaginales durante 5 meses después del parto. Estos resultados indican que la bacteria se elimina en el moco vaginal durante un largo periodo posterior al parto, lo que constituye una fuente de contaminación para el medio ambiente y el ser humano.

En otro estudio realizado en el corzo en los Países Bajos se encontró una prevalencia del 23 % detectándose ADN de *C. burnetii* en diferentes órganos de corzos abatidos o sacrificados entre el 2008-2010. Este estudio confirmó la infección en ambos sexos y en todos los años de muestreo, en animales sin ningún problema sanitario aparente (Rijks 2011). Estos dos estudios sugieren la posibilidad de que los ungulados silvestres sean capaces de mantener la infección cuando se dan las condiciones adecuadas y que, por tanto, puedan representar un riesgo de infección al hombre.

2.4.3.c. Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad distribuida en todo el mundo. Aunque ha sido erradicada en algunos países, continúa siendo importante en muchas áreas de producción ganadera. Las principales y más comunes manifestaciones clínicas de la brucelosis en los ruminantes son el fallo reproductivo incluyendo los abortos o el nacimiento de animales no viables, orquitis y epididimitis. En el hombre cursa como una enfermedad febril septicémica (fiebre de Malta) o infecciones focalizadas (Bengis et al. 2004).

En principio, cada especie ocasiona la enfermedad en un determinado hospedador: *Brucella abortus* en el ganado bovino y *B. melitensis* en el ganado ovino y caprino, siendo las principales especies zoonóticas y las que normalmente están incluidas en las campañas de control o erradicación oficiales.

La brucelosis bovina está prácticamente erradicada en la mayor parte de los países desarrollados, pero su prevalencia es muy alta en otras zonas del mundo, como en países al sur y este de la Unión Europea. La brucelosis ovina y caprina, además de afectar a estas especies y aunque los sistemas de producción se han intensificado, afecta frecuentemente a pequeños ruminantes, yaks, camellos y búfalos. Esta infección tiene una elevada prevalencia en muchos países, en los que existe una gran dificultad para llevar a cabo adecuados programas de control y garantizar así su eficacia, y es la responsable de la mayor parte de los casos de brucelosis en el hombre en todo el mundo (Blasco 2010, 2011).

2.4.3.c.1. Etiología

La Brucelosis está causada por bacterias del género *Brucella*, descrito por Meyer y Shaw (1920). *Brucella* spp. es un bacilo corto Gram negativo, pequeño, inmóvil y aerobio estricto, de crecimiento lento, que no posee cápsulas, ni flagelos, ni fimbrias, no forma esporas y es intracelular facultativo (Blasco y Gamazo 1994).

Las especies de *Brucella* se han establecido según distintos criterios como el de tipo de hospedador preferente. *Brucella abortus* (bovino) y *B. melitensis* (ovejas y cabras) son las especies más comunes y más habitualmente compartidas entre ungulados domésticos y silvestres y que presentan un mayor riesgo de infectar al hombre (Bengis et al. 2004; Van Campen y Rhyan 2010). *Brucella mellitensis* fue descrita por David Bruce en 1887 a partir de un marinero muerto por fiebres de Malta. Diez años más tarde se aisló *B. abortus* en fetos abortados bovinos (Bang 1906). Se han descrito otras especies de *Brucella* spp. asociadas al cerdo (*B. suis*), la oveja (*B. ovis*), el perro (*B. canis*), la rata (*B. neotomae*), mamíferos marinos (*B. ceti* y *B. pinnipedialis*), roedores (*B. microti*) y el hombre (*B. innopinata*). Exceptuando *B. ovis* y *B. neotomae*, todas las demás son especies zoonóticas (Van Campen and Rhyan 2010; Hubalek et al. 2007; Scholz et al. 2008).

2.4.3.c.2. Transmisión

La bacteria se elimina por leche, orina y heces, pero la principal fuente de eliminación de *Brucella* spp. es la excreción vaginal durante el parto o el aborto, contaminando el suelo, los corrales, el agua de arroyos, canales y pozos. *Brucella* es capaz de sobrevivir en el medio ambiente por periodos relativamente largos. En las heces se mantiene viable hasta 100 días, en la tierra hasta 80 días y en ambientes helados su supervivencia puede prolongarse durante meses (Castro et al. 2005). Los animales se contagian por ingestión de material contaminado, por penetración de la bacteria a través de la piel o por inhalación de la misma vehiculada en el polvo de los establos. Por otra parte, los moruecos infectados también pueden excretar *B. mellitensis* en el semen, pero el papel epidemiológico de los machos es mínimo.

El riesgo de infección en el hombre suele estar asociado al manejo o consumo de productos de animales infectados, por contacto directo con los animales infectados, sus fluidos o tejidos contaminados o el ambiente donde ha sobrevivido la bacteria. Al menos en 91 especies de mamíferos silvestres, pertenecientes a 9 Ordenes diferentes, se ha detectado la infección por una o más especies de *Brucella* (Thorne 2001). Normalmente, la infección del hombre se produce por ingestión de leche no pasteurizada o por consumo de queso fresco, y en los casos ocupacionales la infección tiene lugar través de heridas en la piel, principalmente durante la asistencia a partos y por la inhalación de aerosoles, siendo estos casos más esporádicos (D’Anastasio et al. 2011). La transmisión entre personas es muy rara y puede darse por vía sexual (Corbel 1997; Meltzer et al. 2010). Las especies zoonóticas más importantes son *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis*, siendo *B. melitensis* la especie más virulenta (10 a 100 bacterias pueden infectar a un hombre) y causa el cuadro clínico más grave. *Brucella canis* es la menos virulenta.

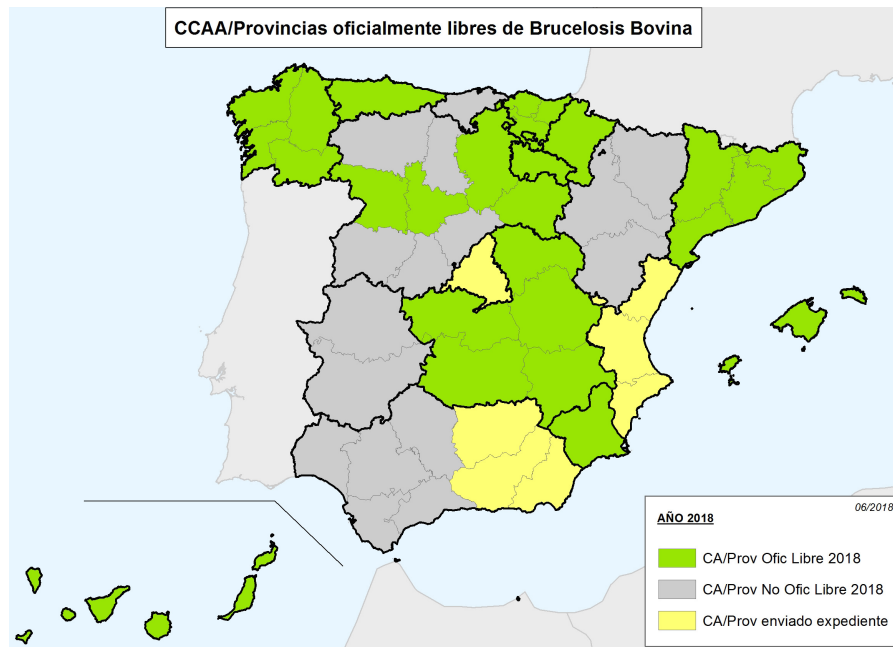
La principal vía de transmisión de agentes transmisibles entre la fauna silvestre y el ganado doméstico la constituyen los pastos y el agua, al igual que en el caso de *Brucella*. El acceso a pastos y zonas comunes de bebida depende de los sistemas de manejo de las explotaciones de rumiantes domésticos, pero está claro que en sistemas extensivos o semi-extensivos la probabilidad de compartir pastos o abrevaderos entre el ganado doméstico y la fauna silvestre aumenta en gran medida. La mayor parte de las explotaciones de bovino de aptitud láctea son intensivas y salvo las novillas o las vacas secas en algunas zonas de España, los animales permanecen confinados y sin acceso a

pasto o fuentes de agua comunales, pero no sucede lo mismo con la mayor parte de las explotaciones bovinas, ovinas y caprinas de carne o de aptitud mixta.

2.4.3.c.3. Situación actual en los rumiantes domésticos

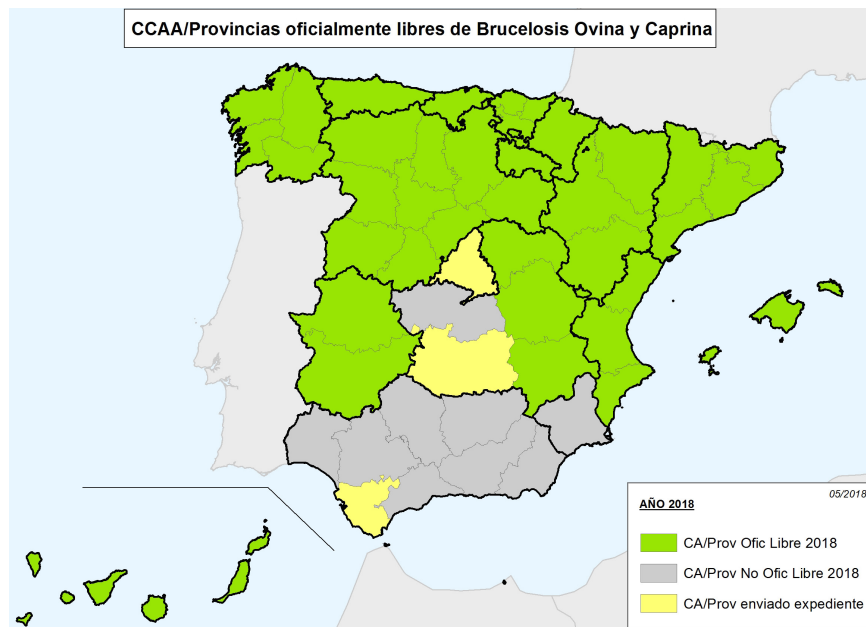
La situación epidemiológica en España ha mejorado a lo largo de los años, asociada a los programas de erradicación oficiales puestos en marcha tanto en el ganado bovino, como en el ovino y caprino. La situación en el ganado bovino parece estar más controlada, a pesar de que se siguen produciendo brotes de enfermedad esporádicos, algunos de los cuales están asociados a *B. mellitensis*. En la Figura 12 se muestra un mapa de la situación actual de la brucelosis bovina, en los que se puede observar cómo, aparentemente, la situación está controlada, exceptuando zonas de Extremadura, Cantabria y Andalucía tanto a nivel de rebaño como a nivel individual, algunas de ellas presumiblemente asociadas a la convivencia con ungulados silvestres.

Figura 12.: Situación de la brucelosis bovina en España (Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis Bovina 2018 MAPAMA).



En cuanto a la situación de la brucelosis ovina y caprina, aunque ha mejorado a lo largo de los años, siguen existiendo prevalencias bajas en diferentes zonas de España, principalmente en la mitad sur del país, asociadas a zonas de producción de ovino y caprino extensivo o semi-extensivo (Figura 13):

Figura 13.: Situación de la brucelosis ovina y caprina en España (Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis ovina y caprina 2017-2018 MAPAMA).



2.4.3.c.4. Situación actual en ungulados silvestres

La interconexión entre el ciclo doméstico y silvático de *Brucella* se ha descrito en Yellowstone (Greater Yellowstone Area) con la circulación de *B. abortus* entre el bisonte (*Bison bison*), el wapití (*Cervus canadensis*) y el ganado bovino. Esta interfaz está asociada a sistemas de manejo del wapiti, el bisonte y el ganado bovino, que hacen que exista un contacto mucho más intenso entre las tres especies, permitiendo mantener la infección en el wapiti, que en otras condiciones no sería posible (Van Campen and Rhyan 2010). En Norteamérica hay datos serológicos que demuestran el contacto de animales salvajes con *B. abortus* en zonas donde la enfermedad es endémica. Sin embargo, como sucede con el ciervo de cola blanca y el ciervo mula estas especies de rumiantes silvestres no se consideran reservorios de la bacteria. Se han realizado más de 30 estudios en EE.UU., en muchos de ellos se han descrito prevalencias elevadas en el ganado bovino, y tan solo se detectaron 42 ciervos seropositivos de 25.000 muestreados y, únicamente, se pudo realizar un aislamiento a partir de un ciervo de cola blanca en libertad (Davis 1990).

Brucella melitensis no suele afectar a animales silvestres, pero se ha descrito algún brote en rebeco y en ibex (*Capra ibex*) en Europa (Godfroid, 2002). Igualmente, Gortázar et al. (2007) consideran que, a pesar de haber grandes diferencias entre países, no parece que haya en Europa un reservorio silvestre de *B. abortus* o *B. melitensis*. Esta idea se ve respaldada por los estudios realizados en España, que consideran que el ciervo no es una especie que parezca ser un reservorio adecuado de *Brucella* (Boadella et al. 2010; Muñoz et al. 2010; Serrano et al. 2011; San Miguel et al. 2017).

2.4.4. Enfermedades víricas

2.4.4.a. Rinotraqueitis infecciosa bovina / Vulvovaginitis pustular infecciosa

La rinotraqueitis infecciosa bovina es una enfermedad caracterizada por originar diferentes cuadros clínicos dependiendo de la cepa y la vía de infección. Tiene una distribución cosmopolita y su importancia está asociada tanto a las repercusiones clínicas asociadas, así como a las barreras comerciales asociadas a su distribución y prevalencia.

2.4.4.a.1. Etiología

El Herpesvirus Bovino tipo 1 (BHV-1) es un virus DNA, perteneciente a la Familia Herpesviridae. El nombre deriva del griego (herpein) “arrastrarse”, asociado a las lesiones típicas producidas por dos herpesvirus humanos, el Virus Herpes Simple (HSV) y el Virus de la Varicela- Zoster (VZV). Dentro de este grupo, se encuadran cerca de 200 virus con gran variabilidad de hospedadores (Roizman y Pellett 2001). La mayor parte de los Herpesvirus están asociados con una única especie y todas las especies animales investigadas tienen al menos un Herpesvirus asociado. Este hecho indica que los Herpesvirus y sus hospedadores han evolucionado conjuntamente (Davison 2002, 2009).

El Herpesvirus Bovino tipo 1 (BHV-1) pertenece a la subfamilia Alphaherpesvirinae y al género *Varicellovirus*. En esta subfamilia se incluyen virus con ciclos de replicación cortos y con la capacidad de producir infecciones latentes, principalmente en neuronas. Inicialmente Wyler et al. (1989) subdividió las cepas hasta entonces conocidas en 5 subtipos: 1, 2a, 2b, 3a y 3b. Se podía establecer una correlación parcial entre los diferentes subtipos y la clínica presente en los animales de los que se aislaron esas cepas. Las cepas del subtipo 1 estarían asociadas principalmente a IBR; las de subtipo 2, principalmente a problemas reproductivos y las del subtipo 3, a alteraciones neurológicas (Wyler et al. 1989; Tikoo et al. 1995). Posteriormente, Roizman et al. (1992) reclasificaron las cepas encefálicas como BHV-5. Todas las cepas de BoHV-1 aisladas hasta el momento se clasifican, por tanto, en los subtipos BoHV-1.1, BoHV-1.2a y BoHV-1.2b y son serológicamente indistinguibles (Ruiz et al. 2008). La mayoría de las cepas BoHV-1.1 se han aislado de casos de Enfermedad Respiratoria Bovina (ERB) o abortos y la mayoría de las cepas BoHV-1.2 de lesiones en órganos genitales, habiéndose detectado diferencias en la secuencia de ADN (Engels et al. 1981; Meztler et al. 1985; Miller et al. 1991). Los subtipos 1.1 y 1.2a se han asociado habitualmente a brotes graves de ERB y abortos (Miller et al. 1991). El subtipo 1.2b no se ha asociado a abortos (Whetstone y Miller 1989; Edwards et al. 1990; Smith et al. 1995). Por tanto, el BoHV-1 infecta principalmente al ganado bovino, especie en la que provoca un amplio espectro de manifestaciones clínicas: rinotraqueitis, vulvovaginitis pustular infecciosa, balanopostitis pustular infecciosa, conjuntivitis, aborto y enteritis.

2.4.4.a.2. Transmisión

La infección normalmente ocurre por el contacto del virus con mucosas. A nivel respiratorio, la infección se produce a través de aerosoles o mediante contacto directo con mucosas de otros animales o con secreciones nasales que contengan el virus. En cambio, a nivel genital, la infección se produce por contacto directo durante la cópula o a través de semen infectado. Debido a que la crio-preservación, el semen mantiene la capacidad infectante del virus, los toros que se utilizan para realizar inseminación artificial deben

ser libres de la infección por BoHV-1 (Muylkens et al. 2007). Así mismo, se ha descrito una posible transmisión a larga distancia vía aerógena (Nylin et al. 1998).

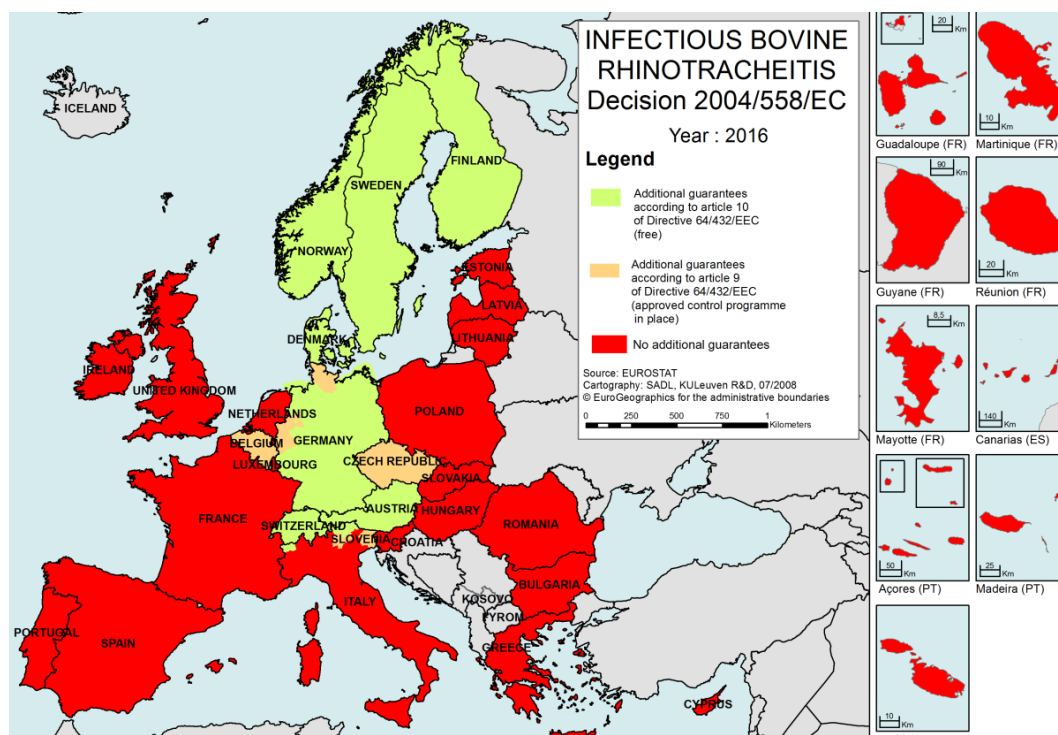
Todos los virus incluidos en la subfamilia Alphaherpesvirinae tienen la capacidad de establecer infecciones latentes en el hospedador asociado. Tras la replicación en las mucosas, el BoHV-1 tiene la capacidad de infectar las terminaciones nerviosas y ascender hacia el SNC, principalmente a través del nervio trigémino, aunque generalmente no alcanza el SNC, quedando acantonado a nivel del ganglio trigémino, donde se establece la infección latente. De forma similar ocurre en el ganglio sacro cuando la vía de infección es la genital (Sheffy and Davies 1972; Narita et al. 1976, 1981; Ackermann y Wyler 1984; Gerds et al. 2000; Muylkens et al. 2007). Todas las cepas del BoHV-1 generan latencia, incluso las cepas vacunales vivas atenuadas y las modificadas genéticamente vía intranasal (cepas termosensibles). Posteriormente, se puede producir una reactivación asociada a estímulos inmuno-depresores, como el estrés, el tratamiento con corticoides, el parto, el transporte y las infecciones concomitantes. Tras la reactivación, el animal infectado puede excretar el virus y es una fuente de infección para nuevos animales, siendo responsable de nuevas infecciones agudas y de la perpetuación de la transmisión del virus en la naturaleza (Kutish et al. 1990).

2.4.4.a.3. Situación actual en el ganado bovino

El BoHV-1 es el responsable de grandes pérdidas en el sector bovino, no solo por los cuadros clínicos que origina en el hospedador asociado, el ganado bovino, sino por las trabas comerciales que supone entre países o zonas en las que está erradicado o en vías de erradicación y las zonas en las que esta enfermedad es endémica. Los programas de erradicación se basan en la eliminación de animales seropositivos cuando la prevalencia es muy baja o en programas de vacunación, control y restricción de movimientos de ganado cuando la prevalencia es mayor (Ackermann et al. 2006).

La situación actual en Europa es que en la mayoría de los países la infección es endémica. Solamente hay seis países en los que la enfermedad se encuentra erradicada: Austria, Dinamarca, Suecia, Finlandia, Noruega y Suiza. Así mismo, hay algunas regiones de Italia y Alemania con programas de control aprobados (Figura 14):

Figura 14.: Situación de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Europa.



La situación en España es, incluso, más compleja, ya que debido al potente sector de producción de carne de ternera y a la escasez de producción de terneros en nuestro país, importamos un elevado número de terneros, principalmente de países en los que el BoHV-1 es endémico. En 2017 la cifra fue de casi de 650.000 animales y en 2018 superó los 700.000 (San Miguel 2018), por lo que el riesgo de infección en nuestro país es muy elevado. Los datos aportados por un estudio realizado en 2018 por MAPAMA, demuestran que la prevalencia de la enfermedad en rebaños en explotación extensiva, con posible contacto con ungulados silvestres, es muy elevada: 63,46 % (Romero 2018). La seroprevalencia encontrada en ganado de lidia en Salamanca fue del 99,92 a nivel de rebaño y del 85,29 % intra-rebaño (Posado et al. 2013).

2.4.4.a.4. Situación actual en ungulados silvestres

Otro problema añadido con relación a la erradicación en un país o región es la capacidad del BoHV-1 de atravesar la barrera de especie e infectar a otras especies domésticas o silvestres.

Se han realizado estudios seroepidemiológicos en otras especies domésticas y silvestres, con el fin de determinar si podían ser reservorios del BoHV-1. Los datos obtenidos de campo y de infecciones experimentales demuestran que se pueden producir infecciones en otras especies de ruminantes. Sin embargo, no parece factible que ninguna de estas especies pueda realizar la función de reservorio alternativo al ganado bovino (Muyilkens et al. 2007). Se han detectado infecciones agudas y latentes en el ganado ovino, pero no parece que tenga un papel importante en la infección del ganado bovino (Hage

1997). Además, se han conseguido infecciones experimentales en ovinos y caprinos. El ciervo parece tener una susceptibilidad limitada, al no establecerse la infección latente (Thiry et al. 2006) y la transmisión entre ciervos, si existe, debe ser mínima (Mollema et al. 2005). Se han detectado anticuerpos frente al BoHV-1 en muchas especies de ruminantes (Thiry y Lemaire 2001) y se han aislado y caracterizado algunos alphaherpesvirus relacionados con BoHV-1 (Thiry et al. 2006, 2007) (Tabla 9).

Tabla 9.: Alfaherpesvirus de rumiantes relacionados con el BoHV-1.

Virus	Hospedador	Signos Clínicos Enfermedad	Referencia
Herpesvirus bovino 1	Bovino	IBR	Johnston et al. 1962.
Herpesvirus bovino 5	Bovino	Encefalitis	Bagust y Clark 1972.
BoHV-5			French 1962.
Bubaline herpesvirus 1	Búfalo de agua	Infección genital	St George y Philpott
BuHV-1	(<i>Bubalus bubalis</i>)	subclínica	1972.
			De carlo et al. 2004.
Herpesvirus caprino 1	Caprino	Vulvovaginitis, abortos,	Saito et al. 1974.
CpHV-1		muerte neonatos	Keuser et al. 2002, 2004
			a,b.
Herpesvirus de ciervo 1	Ciervo rojo	Conjuntivitis	El Azhary et al. 1979.
CvHV-1			Inglis et al. 1983.
Herpesvirus de ciervo 2	Reno	Infección genital	Ek-Kommonen et al.
CvHV-2	(<i>Rangifer tarandus</i>)	subclínica	1986.
		Keratoconjuntivitis	Tryland et al. 2009.
			Das Neves et al. 2010
Herpesvirus del Wapiti 1	Wapiti	Infección genital	Deregt et al. 2000.
ElkHV- 1		subclínica	

Debido a la estrecha relación genética y antigénica existente entre los alphaherpesvirus de los rumiantes, se pueden emplear pruebas ELISA comerciales, basadas en BoHV1, para la realización de estudios de seroprevalencia, pero resulta imposible con esta técnica dilucidar qué alphaherpesvirus ha estado relacionado con esa respuesta inmune que se está valorando (Nixon et al. 1988; Martin et al. 1990; Lyaku et al. 1992; Ros y Belak 2002; Deregt et al. 2005; Graham et al. 2017; Roic et al. 2018).

Se han llevado a cabo estudios para determinar la seroprevalencia del BoHV-1. En la mayor parte de ellos se han utilizado ELISAs comerciales y en algunos casos se ha realizado seroneutralización frente a una cepa de BoHV-1 o una seroneutralización doble frente a una cepa de BoHV-1 y una cepa de CvHV-2 (Das Neves et al. 2009b; Tryland et al. 2009). Das Neves et al. (2009a) compararon varias pruebas ELISA y recomendaron la utilización de una prueba ELISA de bloqueo que emplea la glicoproteína B como antígeno (gB blocking LSITM-Laboratoire Service International, France). En la Tabla 10, se muestran los datos de prevalencia de alphaherpesvirus en rumiantes silvestres. Cabe resaltar los pocos datos existentes sobre la prevalencia del BoHV-1 en el ciervo rojo.

Tabla 10.: Seroprevalencias de alfaherpesvirus de rumiantes silvestres.

Especie	País	Prevalencia %	Referencia
Reno	Noruega	49	Das Neves et al. 2009.
Reno	Suecia	53	Kautto et al. 2012.
Sika deer	Irlanda	0	Graham et al. 2017.
Ciervo rojo	Irlanda	0	Graham et al. 2017.
Ciervo rojo	Croacia	25.6	Roíc et al. 2018.
Ciervo rojo	Alemania	28	Frölich et al. 2006.
Corzo	Croacia	12.5	Roíc et al. 2018.
Corzo	Alemania	16	Frölich et al. 2006.
Gamo	Irlanda	0	Graham et al. 2017.
Gamo	Croacia	0	Roíc et al. 2018.
Gamo	Italia	2	Giovannini et al. 1988.
Gamo	Alemania	2	Frölich et al. 2006.
Gamo	España	0,2	Boadella et al. 2010
Ciervo de cola Blanca	Canadá	57-16-7	Sadi et al. 1991. (Datos de 1985, 1986 y 1987)

2.4.4.b. Diarrea vírica bovina / Enfermedad de las mucosas

La diarrea vírica bovina es una enfermedad que afecta a una amplia gama de rumiantes, con una distribución cosmopolita y siendo endémica en muchos países, entre ellos España. Desde la primera descripción de la enfermedad realizada por Olafson et al. (1946) en la que se describía una aparente nueva enfermedad transmisible del ganado bovino, se han descrito numerosos síndromes asociados a esta enfermedad. Estos síndromes afectan al aparato reproductivo, respiratorio, al sistema inmune, linfático, musculoesquelético y al SNC.

2.4.4.b.1. Etiología

La etiología vírica de una enfermedad del ganado bovino, denominada diarrea vírica bovina (BVD), se estableció en 1946 (Olafson et al. 1946). A principios de los años 60, se determinó su relación con el virus de la peste porcina clásica y 10 años más tarde se incluyó en el grupo el virus de la enfermedad de la frontera (Darbyshire 1960; Dinter, 1963; Plant 1973). El virus de la BVD (BVDV) está encuadrado dentro de la Familia Flaviviridae incluido dentro del género *Pestivirus*, del que forman parte el virus de la enfermedad de la frontera (BDV) y el virus de la peste porcina clásica PPC o Hog Cholera Virus (HCV) (Collet et al. 1988; Meyers et al. 1991). A diferencia del HCV, los pestivirus que afectan a rumiantes tienen la capacidad de cruzar la barrera placentaria en hembras gestantes, penetrar en el feto y establecer una infección persistente, dando lugar a animales que se denominan persistentemente infectados (PI), que juegan un papel fundamental en la epidemiología del virus.

En la actualidad, el género *Pestivirus*, que originalmente estuvo formado por las tres especies asociadas al animal en el que aparecieron, BVDV, BDV y HCV (Pellerini 1994, Ridpath 1994), está formado por cuatro especies reconocidas: Bovine Viral Diarrhea virus 1 (BVDV-1), BVDV-2, HCV y BDV (Simmonds et al. 2012). Además, existen otras cuatro especies estrechamente relacionadas, el virus Bungowannah (porcino), virus de la girafa, el HoBi-like virus y el virus Pronghorn. Estos dos últimos virus, que afectan a rumiantes, y el virus Bungowannah deben ser considerados como nuevas especies (Kirkland et al. 2007; Bauermann et al. 2012; Neill et al. 2014). El HoBi-like virus afecta al ganado bovino y está presente en Europa (Giammarioli et al. 2014). En la actualidad, por tanto, se considera que existen las especies y subtipos de *Pestivirus* que aparecen en la Tabla 11.

Tabla 11.: Especies y subtipos del género *Pestivirus*.

Especie	Subtipos
CSFV	
BDV	1, 2 y 3
BVDV 1	17 subtipos a-q
BVDV 2	a, b y c
BVDV 3 o Hobi-like virus	2 subtipos
Otras Posibles Especies	H-138 de Jirafa Proghorn virus Bungowannah virus

Se diferencian dos biotipos de BVDV, tanto del BVDV-1 como del BVDV-2, el citopático y el no citopático, según su comportamiento en los cultivos celulares (Lee y Gillespie 1957; Gillespie et al. 1960). Las cepas no citopáticas son las que predominan en la naturaleza, y los aislamientos de cepas citopáticas sólo se han realizado a partir de animales con la enfermedad de las mucosas. Todas las cepas muy virulentas estudiadas hasta la fecha han sido no citopáticas (Corapi et al. 1990; Bolin y Ridpath 1992; Carman et al. 1998; Ellis et al. 1998; Ridpath et al. 2000; Liebler-Tenorio et al. 2002) y son las cepas no citopáticas las únicas que han demostrado poder generar una infección persistente en el feto (Nettelton y Entrican 1995).

2.4.4.b.2. Transmisión

La transmisión de la infección puede producirse tanto por vía horizontal como vertical. En la transmisión horizontal, el principal modo es el contacto directo o la transmisión por aerosoles, siendo la principal vía de entrada la oro-nasal, produciéndose la replicación del virus en el tracto respiratorio superior, en las tonsilas (Bolin 1990; Traven et al. 1991). Además de la saliva y la descarga óculo-nasal, también pueden jugar un papel importante en la transmisión del virus las heces (Lang-Ree et al. 1994), las secreciones uterinas, la placenta o el semen (Meyling et al. 1988). Los animales PI son la pieza fundamental para la permanencia del virus en la naturaleza. A nivel epidemiológico tienen importancia las infecciones agudas (Meyling et al. 1990), pero sobre todo la existencia de PIs, que tienen la capacidad de eliminar de forma continua y durante toda

la vida el virus al medio ambiente (Werdin et al. 1989; Brock et al. 1991; Paton et al. 1989; Nettelton y Entrican 1995). La transmisión vertical, que origina un PI, se puede producir por dos vías: i) la infección del feto a partir de una hembra que es PI y sucede en el 100 % de los casos; ii) una infección aguda de la hembra gestante por el BVDV durante los primeros 120-125 días de gestación. La probabilidad del nacimiento de un PI es mayor a partir de los 60 días de gestación (Liess et al. 1984; Moerman et al 1993).

La transmisión interespecífica es posible y la que se ha demostrado hasta el momento se recoge en la Tabla 12.

Tabla 12.: Transmisión interespecífica del BVDV.

Especie Origen	Especie Destino	Referencia
Bovino	Porcino	Paton et al. 1992.
Bovino	Ovino	Carlsson, U. 1991.
Bovino	Cévidos	Passler et al. 2014
Ovino	Porcino	Roehe et al. 1992.
Cabra	Bovino	Passler et al. 2014
		Nettelton 1990.

2.4.4.b.3. Situación actual en los ruminantes domésticos

La posibilidad de establecerse una infección persistente va a depender de la virulencia de la cepa y la dosis infectiva, pero hay diferencias entre las especies domésticas de ruminantes. Es extremadamente raro que pueda generarse un cabrito PI, ya que la infección por el BVDV en cabras produce una severa placentitis, mediante infección experimental, que hace casi inviable el establecimiento de una infección persistente (Depner et al. 1991), aunque Hurtado et al. (2004) mantuvieron a una cabra montés en cautividad un mes siendo seronegativa y positiva a antígeno durante ese periodo. En el ganado ovino, en el caso de BDV, la posibilidad de supervivencia de un feto infectado en los primeros 60-80 días de gestación, dependiendo de las cepas, es en torno al 50 % y en el ganado bovino el posible establecimiento de la infección persistente por cepas de BVDV, cuando hay una infección aguda en los primeros 120-125 días de gestación, es del 70 % (Nettelton y Entrican 1995).

En la mayor parte de los países la presencia del BVDV es endémica, considerándose que en zonas con alta densidad de ganado la prevalencia puede ser igual o superior al 80 % (Houe 1999). Se estima que la seroprevalencia en el ganado bovino está por encima del 60 % y en el ovino, que es más variable, entre el 0 y el 50 % (Nettelton y Entrican 1995). La probabilidad de que se produzca un brote en una explotación va a estar asociada a la seroprevalencia en la zona, a la prevalencia de animales PI en la zona, región o país y al número de animales que entren en esa explotación (Houe 1999). En un metaanálisis realizado por (Houe 2005), considerando la seroprevalencia a nivel individual, se determinó que las prevalencias frente a BVDV en diferentes países estaban entre el 12 y el 89 %. Sin embargo, el mayor número de estudios revisados describían prevalencias elevadas, entre el 60-70 %. En cuanto a las prevalencias encontradas con respecto a animales PI, muchos estudios encontraron prevalencias elevadas, que oscilaron entre 0,75 y 2 % (Brock, 2003; Houe, 1999), pero hubo otro grupo de estudios con

prevalencias bajas (0,1-0,2 %). Por tanto, aunque la distribución del virus es generalizada y su prevalencia es alta, deberían distinguirse dos tipos de zonas: las de alta y baja prevalencia.

En Europa hay muchos países con prevalencias elevadas, aunque los países nórdicos (Noruega, Finlandia y Austria), en los que se han implementado programas de control/erradicación poseen prevalencias más bajas (Houe 2005). En EE.UU., la prevalencia del BVDV-1 es mayor, aunque la prevalencia del BVDV-2 es también elevada 24-47 % (Carman 1995; Bolin y Ridpath 1998). En Europa predomina el BVDV-1 y en España el subtipo 1b (Arias et al. 2003; Hurtado et al. 2003; Jackova et al. 2008).

La prevalencia en España, aunque solamente hay estudios circunscritos a determinadas zonas del país, es muy elevada, tanto en producción de leche, como en producción extensiva y en cebaderos. Con los datos existentes, la prevalencia de rebaño varía entre el 57,1 % y el 100 % y la seroprevalencia individual entre el 21,1 % y el 65,6 % (Tabla 13):

Tabla 13: Prevalencias de BVDV en el ganado bovino en España.

Zona / región	Año	Prevalencia individual	Prevalencia individual	Referencias
Asturias	1988	84.4 %	48.8 %	Prieto 1988
León	1994	91.5 %	51.3 %	Álvarez et al. 1994
Extremadura	1997	-	53.3 %	Marín 1997
Andalucía	1997	100 %	-	Gómez Pacheco et al. 1997
La Coruña	2001	57.1 %	-	Gutián 2001
Asturias	2001	86 %	21.1 %	Mainar et al. 2001
Madrid	2004	94.2 %	65.6 %	Vega et al. 2004
Andalucía	2006	70.9 %	42.3 %	Gómez Pacheco et al. 1997

2.4.4.b.4. Situación actual en ungulados silvestres

La introducción de la infección por BVDV en una nueva especie estará asociada seguramente a la exposición a un animal PI. El mantenimiento de la infección en esa especie, en un determinado área, está relacionado con la persistencia de la exposición a animales PI o con la posibilidad de que la especie genere, por infecciones de hembras gestantes en el primer tercio de la gestación, animales PIs.

Para demostrar la evidencia de que puede existir un ciclo biológico silvestre del BVDV en ruminantes silvestres, se debería demostrar la presencia de anticuerpos, se debería poder aislar el virus a partir de infecciones en estos animales y se debería demostrar la capacidad del BVDV de generar infecciones persistentes en estas especies de ruminantes silvestres.

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos en 50 especies de ruminantes en cautividad o de vida libre, incluyendo camélidos, cérvidos, antílopes y bóvidos y 17 especies de animales silvestres en África, antílope proghorn (*Antilocapra americana*), bisonte (*Bison bison*), wapití, alce (*Alces alces*). Las prevalencias han sido superiores en especies más gregarias como el reno (*Rangifer tarandus*) o el bisonte y más bajas en especies menos gregarias, como el alce o los antílopes. Esto podría estar asociado a la

posibilidad de diseminación y contacto con el virus (Van Campen y Williams 1996; Van Campen et al. 2001; Ames 2005).

Hay muy pocos estudios de seroprevalencia de BVDV en el ciervo rojo realizados en España en los últimos años. Cabe destacar dos llevados a cabo en Ciudad Real (Montes de Toledo y Sierra Morena) y otro en Andalucía. Las prevalencias encontradas fueron del 0,1 % en Andalucía, entre el 10 y 52,94 % (media interanual 19,47 %) en el estudio realizado en Ciudad Real (Rodríguez-Prieto et al. 2016; Paniagua et al. 2016). También hay trabajos en otros países europeos que describen valores bajos de seroprevalencia, de entre el 0 y el 7,4 % (Frölich 1995; Nielsen et al. 2000; Lillehaug et al. 2003; Krametter et al. 2004; Olde Riekerink et al. 2005; Frölich et al. 2006; Köppel et al. 2007; Sedlak et al. 2009; Casaubon et al. 2012).

Se han detectado infecciones en numerosas especies de ungulados silvestres, incluyendo camélidos: vicuña (*Vicugna pacos*), llama (*Lama glama*) y dromedario (*Camelus dromedarius*), cérvidos como el corzo, el ciervo rojo, el ciervo de cola blanca, el ciervo mula y otras especies como el cerdo (*Sus scrofa domesticus*), la oveja, la cabra, la cabra de las montañas rocosas (*Oreamnos americanus*) y la girafa (*Giraffa camelopardalis*) (Ames, 2005; Vilcek and Nettleton, 2006; Van Campen y Rhyhan 2010). Algunos de estos virus aislados de animales salvajes son indistinguibles de los aislados del ganado bovino. Este hecho hace pensar que el origen ha sido el ganado doméstico y que puede existir la capacidad de reinfección del ganado bovino doméstico a partir de los ungulados silvestres (Van Campen et al. 2001; Nelson et al. 2008; Pogranichniy et al. 2008; Chase et al. 2008). Así mismo, se ha comprobado la existencia de la infección persistente en animales silvestres, en el ciervo mula, la cabra de las montañas rocosas, el sarrio (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) y ciervo de cola blanca (Hurtado et al. 2004; Nelson et al. 2008; Chase et al. 2008; Passler et al. 2008; Duncan et al. 2008 a, b; Passler et al. 2010).

Por último, Passler et al. (2009) demostraron que se producía la infección persistente del feto en ciervas en el primer tercio de gestación en contacto con un ciervo de cola blanca PI. Posteriormente, Ridpath et al. (2012), demostraron que el cuadro clínico asociado a la infección de hembras de ciervo de cola blanca es muy parecido al demostrado en el ganado bovino, siendo el primer tercio de gestación crítico para que se puedan generar PIs tras la infección aguda de la hembra.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, los cérvidos pueden ser un reservorio eficaz de BVDV en la naturaleza y tienen la capacidad, en determinadas circunstancias, de mantener la infección en el medio natural. Por tanto, habría que tenerlos en cuenta en cualquier plan de control o erradicación que se pudiera plantear.

2.4.4.c. Lengua azul y enfermedad de Schmallenberg

2.4.4.c.1. Lengua Azul

La lengua azul es una enfermedad no contagiosa que afecta a los rumiantes, cuya gravedad varía según las diferentes especies, con signos clínicos más graves en los ovinos (Anon 2005; Darpel et al. 2007). El primer brote grave descrito sucedió en Sudáfrica en 1905, produciéndose una elevada mortalidad en ovejas merinas (Spreull 1905). Aunque la enfermedad aguda afecta principalmente al ganado ovino, la mayor parte de las infecciones cursan de forma subclínica, sobre todo en el ganado bovino (Anon 2005;

Darpel et al. 2007). Cuando aparecen signos clínicos, estos pueden ser muy variables entre individuos y razas, destacando la fiebre, depresión, cojera, edema en la cabeza, conjuntivitis, ptialismo, descargas nasales y muerte (Darpel et al. 2007). En animales gestantes se pueden producir abortos y es muy infrecuente, solamente en los casos más graves, la presencia del color azul en la lengua, de la que proviene el nombre de la enfermedad.

Esta enfermedad se encuentra dentro de la lista de las enfermedades de declaración obligatoria tanto de la OIE como de la Unión Europea (UE). Dado el importante impacto socioeconómico en el sector ganadero, asociado a la morbilidad y mortalidad y a las regulaciones comerciales que origina, se trata de una de las principales preocupaciones sanitarias de las autoridades veterinarias de nuestro país.

2.4.4.c.1.1. Etiología

El virus de la lengua azul (BTV) es un virus RNA, perteneciente a la Familia Reoviridae, Subfamilia Sedoreovirinae y al género *Orbivirus* (Roy 2008; Wilson 2009; Moğ 2018; Maclachlan 2013).

2.4.4.c.1.2. Transmisión

El virus es transmitido por artrópodos, mosquitos del género *Culicoides*, principalmente aquellas especies que pueden actuar como verdaderos vectores, porque se alimentan principal o exclusivamente de ruminantes. De las 1400 especies del género *Culicoides*, menos de 30 se han identificado como potenciales vectores. Las especies que juegan un papel más importante en la transmisión de la enfermedad son *C. imicola* (África, oriente medio, sudeste de Asia y Europa del sur) *C. obsoletus-dewulfi* (norte de Europa), *C. sonorensis* y *C. insignis* (Norteamérica) y *C. brevitarsis* (Australia) (Wilson 2009; Moğ et al. 2018).

Hasta el momento se han identificado 27 serotipos del virus, y en 26 se conoce su origen geográfico. El serotipo 27 detectado en 2014, está todavía en estudio. De estos 27 serotipos, 24 tienen una amplia distribución, 13 serotipos (1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 17, 19, 22 y 24) se han detectado en EE.UU. y 8 serotipos en Europa (1, 2, 4, 6, 8, 9, 11 y 16) (Moğ et al. 2018).

Al depender de un vector artrópodo del género *Culicoides*, la epidemiología del virus está muy relacionada con la climatología en las diferentes áreas de distribución. Es una enfermedad endémica en zonas tropicales, donde el vector está presente durante todo el año, y es estacional en zonas donde el clima no permite la actividad del vector durante las épocas más frías del año. Por tanto, en la mayor parte de los países la enfermedad se presenta de forma estacional durante las épocas cálidas de mayor actividad de los vectores (Maclachlan 2013; Moğ et al. 2018). La situación actual en Europa se puede ver en la Figura 15, donde se muestran las zonas de restricción y los serotipos asociados a esas zonas:

et al. 2009; Perea et al. 2014). Las poblaciones de ciervo pueden representar un riesgo para el mantenimiento y dispersión de la enfermedad en zonas o regiones donde su densidad es elevada.

Los signos clínicos pueden ser muy variables entre individuos y razas incluyendo fiebre, depresión, cojera, edema en la cabeza, conjuntivitis, ptialismo, descargas nasales y muerte (Darpel et al. 2007). En animales preñados se pueden producir abortos y es muy infrecuente, solamente en los casos más graves, la presencia del color azul en la lengua, de la que proviene el nombre de la enfermedad.

Se ha demostrado la susceptibilidad a la enfermedad o la presencia de anticuerpos en diferentes especies de ungulados silvestres: muflón de las montañas (*Ovis canadensis*), muflón (Robinson et al. 1967; Fernández-Pacheco et al., 2008), antílope proghorn (*Antilocapra americana*), bisonte americano, búfalo africano (*Syncerus caffer*) (Howerth et al., 2001; Tessaro y Clavijo, 2001), corzo, gamo, (García-Bocanegra et al. 2011), ciervo de cola blanca, ciervo de cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*), wapiti (Falconi et al. 2011), ciervo rojo (López-Olvera et al. 2010) y cabra montés (García et al. 2009).

Se han realizado diversos estudios de prevalencia en diferentes especies de ruminantes silvestres y frente a diferentes serotipos del BTV en Europa y en España en los últimos años. Las seroprevalencias encontradas en el ciervo rojo en diferentes países europeos, en todos los casos frente al serotipo 8 del virus, oscilaron entre el 1,5 % y el 52,3 % en Bélgica (Linden et al. 2010); entre el 24,3 % y 50,9% en Francia (Rossi et al. 2009, 2013; Corbiere et al. 2012), y en Suiza del 1,7 % (Casaubon et al. 2013). Los resultados de los estudios realizados en España se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Prevalencias de BTV en el ciervo rojo (*Cervus elaphus*) en España.

Zona / Región	Año	Serotipo	Prevalencia Individual	Referencias
Mitad Sur	2006-7	1	66.3 %	García et al. 2009
Mitad sur	2003-7	1	21.9 %	Ruiz-Fons et al. 2008
Cádiz	2007	1-4	53.3 %	Rodríguez-Sánchez et al. 2010.
Andalucía	2006-10	1-4-8	42.3 %	García-Bocanegra et al. 2011
Ciudad Real	2005-10	4	12.9 %	Falconi et al 2012
Mitad sur	2006-12	-	31.5 %	Arenas et al. 2013
Ciervo, Gamo y Corzo				

Se ha conseguido reproducir la infección experimental en dos especies de cérvidos: el wapití y el ciervo rojo (Murray y Trainer 1970; López-Olvera et al. 2010). La viremia perduró 112 días para el serotipo 1 y 98 días para el serotipo 8 en *C. elaphus*. Igualmente, se ha demostrado que la infección en el ciervo rojo cursa sin signos clínicos aparentes (Ruiz-Fons et al. 2008; García et al. 2009; Rossi et al. 2009; López-Olvera et al. 2010; Rodríguez-Sánchez et al. 2010). Los resultados obtenidos demostraron que ambas especies podrían jugar un papel relevante en la epidemiología del virus. Este hecho es fundamental en Europa, donde se han establecido campañas de erradicación y de vacunación frente al virus en ruminantes domésticos, sin poder realizar ningún tipo de

manejo parecido en los rumiantes silvestres, los cuales en algunas zonas presentan densidades parecidas o superiores al ganado doméstico.

2.4.4.c.2. Enfermedad de Schmallenberg

En noviembre de 2011 se describió un nuevo virus denominado “virus Schmallenberg” (SBV) considerado como causa de una enfermedad que afecta principalmente a rumiantes domésticos en varios países de Europa Occidental. Los animales afectados presentaban un cuadro clínico inespecífico, que remitía en pocos días, caracterizado por un incremento de la temperatura corporal ($>40^{\circ}\text{C}$), anorexia, pérdida de condición corporal y caída de la producción láctea (hasta un 50%) (Hoffmann et al. 2012), diarrea, abortos y malformaciones congénitas nerviosas o musculo-esqueléticas (Muskens et al. 2012). El brote de enfermedad a partir del que se aisló el virus se produjo en la zona norte de Westphalia y en los Países Bajos durante el verano y otoño de 2011. Las muestras de suero de rumiantes recogidas en 2010 en Países Bajos, Alemania, Bélgica y Francia fueron seronegativas, por lo que parece que el virus no estaba presente un año antes del brote (Wernike et al. 2015). Tras el brote el virus se expandió rápidamente, detectándose prevalencias de entre el 70-100 % a finales de 2011 en Alemania, Países Bajos y Bélgica. La seroprevalencia es mayor en el ganado bovino que en los pequeños rumiantes (Wernike et al. 2014a). Los signos clínicos inespecíficos que presentaban los animales afectados fueron fiebre, bajada de la producción láctea y diarrea.

Los virus pertenecientes al género *Orthobunyavirus* relacionados con el SBV, producen malformaciones en el feto, fetos momificados, nacimiento de animales prematuros y mortinatos, tras la infección del embrión o feto durante un periodo crítico de la gestación, que en bovino es entre los 3 y 6 meses y en pequeños rumiantes entre los días 30-50 de gestación (Wernike et al 2014b, 2015).

2.4.4.c.2.1. Etiología

El virus de Schmallenberg (SBV) es un virus encuadrado dentro de la Familia Bunyaviridae, género *Orthobunyavirus*, serogrupo Simbu. Se aisló por primera vez a partir de la sangre de una vaca con signos clínicos de la enfermedad, en una granja del pueblo alemán de Schmallenberg (SBV), de donde adquirió el nombre (Hoffmann et al. 2012).

2.4.4.c.2.2. Transmisión

Los virus de la Familia Bunyaviridae son generalmente transmitidos por artrópodos, principalmente mosquitos del género *Culicoides* u otros mosquitos. Las especies fundamentalmente implicadas son *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. chiopterus* y *C. dewulfi* (Wernike et al. 2014a, 2015). La transmisión horizontal directa entre individuos parece descartada (Wernike et al. 2012, 2013 a, b), pero es posible la transmisión vertical, aunque parece que su importancia es baja en bovino (Wernike et al. 2014b; Veldhuis et al. 2014). El virus se ha detectado en semen, pero no se conoce su importancia epidemiológica (Hoffmann et al. 2012; Ponsart et al. 2014; Van der Poel et al. 2014). Se ha determinado que en el 75 % de los animales los anticuerpos presentes tras una infección natural se mantienen detectables al menos durante 6 años (Wernike et al. 2018).

2.4.4.c.2.3. Situación en los rumiantes domésticos

El virus tiene la capacidad de infectar rumiantes domésticos y silvestres. Se han detectado anticuerpos frente al SBV y el RNA del mismo en el ganado bovino, ovino y caprino. En España se describieron los primeros casos en cinco rebaños ovinos en la provincia de Córdoba en 2012 (EFSA, 2012b; RASVE, 2012) y en vacuno de leche y vacuno de carne en 2013 (Rojo et al. 2013; Balseiro et al 2013). Se aisló el virus por primera vez en España a partir de dos fetos con malformaciones en ganado de carne de Salamanca en 2013 (Balseiro et al 2013). En explotaciones de bovino de aptitud cárnica o lechera es muy frecuente detectar seroprevalencias más o menos elevadas en muestreos aleatorios (San Miguel, datos no publicados).

2.4.4.c.2.4. Situación en ungulados silvestres

Se han detectado anticuerpos frente al SBV y el RNA del mismo en el bisonte, alce, vicuña (*Vicugna pacos*), búfalo, gamo, corzo, ciervo (EFSA 2013). Así mismo, se han detectado anticuerpos frente al SBV en muflón e íbice (Fernández-Aguilar et al. 2014; García-Bocanegra et al. 2017; Rossi et al. 2017).

En cuanto a los datos existentes en rumiantes silvestres en Europa, cabe destacar la prevalencia encontrada en Bélgica en los meses de octubre, noviembre y diciembre tras el primer brote de la enfermedad en vacuno de leche de 2011. En el corzo se detectaron seroprevalencias del 34% (octubre) 49,1% (noviembre) y 88,9% (diciembre) y en el ciervo rojo del 20% (octubre), 52,6% (noviembre) y 54,6% (diciembre) (Linden et al. 2012), lo que demuestra una rápida diseminación de la enfermedad.

Otros datos de seroprevalencia en el ciervo rojo encontrados en Europa son del 30,6 % en Polonia (Larska et al. 2014), 0% antes de 2012 y 40 % entre 2012 y 2013 en Italia (Chiari et al. 2013), entre 20,06 y 50 % en Alemania entre los años 2012 y 2015 (Mounchantat et al. 2015), entre el 0 y 49 % en 2012, entre 35 y 85 % en 2013 y entre 46 y 66 % en 2014 en Francia (Rossi et al. 2017).

En España se han realizado pocos estudios sobre la seroprevalencia de SBV en ungulados silvestres. Cabe destacar los realizados por Fernández-Aguilar et al. (2014), que encontraron seroprevalencias del 80% en el corzo, del 7,6 % en el sarrio y del 0% en el muflón en los Pirineos Orientales. En un muestreo realizado en poblaciones de corzo en el norte y sur de España se encontró una prevalencia del 53,3 % (Díaz et al. 2015). En Andalucía, las seroprevalencias encontradas son del 13,3 % en el ciervo rojo, 23,9 % en el gamo, 16,4 % en el muflón, 2,8 % en el jabalí y 0% en el corzo y la cabra montés (García-Bocanegra et al. 2017).

CAPÍTULO III

Justificación y objetivos

España es un país donde la actividad cinegética es un sector económico clave que en 2016 movió 6.475 millones de euros representando el 0,3% del PIB. Destaca la generación de 187.000 empleos, el consumo de carne de caza que ascendió a 44,7 millones de euros y la exportación de piezas de caza abatidas a diferentes países de la Unión Europea, principalmente de carne de jabalí. En total se abatieron 593.000 ciervos y 310.000 jabalíes (Junco, 2018). Además, España cuenta con un 87% del territorio nacional catalogado como terreno cinegético y es uno de los países europeos con mayor número de licencias de caza después de Francia (Caza y Safaris 2017). En este contexto, la gestión pública y privada de las reservas de caza debería contribuir a la preservación de nuestro característico bosque mediterráneo y al mantenimiento de una buena sanidad en las poblaciones de ungulados silvestres para que, por un lado, puedan coexistir de forma sostenible las diferentes especies de ungulados silvestres con el ganado doméstico que comparte los mismos hábitats y, por otro, no sean reservorios de agentes zoonóticos.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto el notable crecimiento que han experimentado las poblaciones de ungulados silvestres (en términos de densidad y expansión geográfica), no solo en nuestro país sino en general en toda Europa en las últimas décadas, lo cual ha conducido a una sobreabundancia de las mismas (Gortazar et al. 2006). Esta sobreabundancia de especies cinegéticas, fundamentalmente de jabalí y ciervo, unida a la ausencia de medidas de vigilancia epidemiológica (activa y pasiva) de las enfermedades transmisibles compartidas por el ganado doméstico, silvestre e incluso los humanos (enfermedades zoonóticas), está planteando importantes problemas sanitarios. De hecho, una deficiente gestión de las poblaciones de ungulados silvestres facilita el contacto directo con las especies de renta domésticas favoreciendo la transmisión de diferentes patógenos de etiología parasitaria, bacteriana y vírica (Gortázar et al. 2006; García-Bocanegra 2012, 2017), teniendo como máximo exponente la tuberculosis (Barasona 2015).

Hasta la fecha, si bien se han realizado numerosos estudios epidemiológicos en nuestro país en fauna silvestre, estos en su mayoría se han enfocado al estudio de enfermedades de declaración obligatoria como la tuberculosis y la lengua azul en diferentes especies de ungulados silvestres, principalmente el jabalí y el ciervo. Por el contrario, son más escasos los estudios que abordan otras enfermedades transmisibles relevantes en la producción y que repercuten en la reproducción y que son compartidas por los rumiantes domésticos y silvestres. Por otra parte, la mayor parte de los estudios han analizado animales de diferentes procedencias. Sin embargo, se desconoce la situación sanitaria de las poblaciones de ciervo sometidas a una gestión cinegética encaminada a la preservación del hábitat mediante una adecuada gestión de los censos, la cual destaca como medida más relevante.

La finca “Los Quintos de Mora” ubicada en el término municipal de los Yébenes y de gestión pública al pertenecer a la red de Parques Nacionales ha sido elegida para realizar los diferentes estudios que comprenden la presente tesis doctoral por el buen conocimiento científico que se posee del ecosistema, en general, y de las poblaciones de las diferentes especies de ungulados, en particular. Además, esta finca lleva siendo objeto de una gestión técnica bien documentada desde hace años, lo cual ha provocado modificaciones significativas en la densidad y la estructura poblacional del ciervo, especie rumiante más abundante en esta reserva de caza. Además, esta finca cuenta con un vallado perimetral, está alejada de grandes explotaciones de ganado doméstico y

carece de rumiantes domésticos desde hace décadas. Todo ello la convierte, a nuestro juicio, en el sitio de estudio ideal para llevar a cabo este trabajo.

Por tanto, en la presente tesis doctoral se ha estudiado por primera vez los efectos de una gestión sostenible en una reserva de caza en España en la prevalencia de las infecciones causadas por los patógenos transmisibles y con impacto en la reproducción más relevantes en los rumiantes domésticos y que son compartidos con el ciervo: i) de etiología parasitaria (infecciones por *N. caninum* y *T. gondii*), ii) de etiología bacteriana (infecciones por *Brucella* spp., *Leptospira* spp. y *C. burnetii*) y iii) de etiología vírica (BVDV, BoHV-1, BTV y SBV). Además, la presente tesis doctoral se enmarca dentro de las directrices de “Una Única Sanidad” ya que se ha considerado la fauna silvestre, el medio ambiente y el estudio de agentes zoonóticos como *T. gondii*, *Brucella* spp., *Leptospira* spp. y *C. burnetii*.

En base a lo anteriormente expuesto el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar el papel que juega el ciervo (*Cervus elaphus*) como reservorio de agentes transmisibles implicados en fallo reproductivo en rumiantes domésticos y silvestres en la reserva nacional de caza “Los Quintos de Mora” sometida a una gestión técnica sostenible y bien documentada.

Los objetivos específicos, comprenden los tres capítulos de esta Tesis Doctoral, que se detallan a continuación:

- **Objetivo 1:**

Efecto de los diferentes ecosistemas y prácticas de gestión en las infecciones por *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en los rumiantes silvestres de España.

Effect of different ecosystems and management practices on *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in wild ruminants in Spain.

El objetivo de este estudio fue estimar la prevalencia de anticuerpos frente a *T. gondii* y *N. caninum* en la subespecie ibérica de ciervo rojo (*Cervus elaphus hispanicus*), en el corzo (*Capreolus capreolus*) y en el rebeco (*Rupicapra rupicapra*) en función del sexo y edad en tres reservas nacionales de caza abiertas (Ancares, Mampodre y Riaño) y comparar estos resultados con las prevalencias obtenidas en el ciervo de una reserva nacional cerrada (Los Quintos de Mora) con vallado perimetral, caza controlada y sin contacto con ganado doméstico en los últimos 50 años. En esta última reserva se compararon los resultados obtenidos en los años 2007 y 2012 para evaluar el efecto de la puesta en marcha de medidas de gestión.

- **Objetivo 2:**

Seroprevalencia de leptospirosis, brucelosis y fiebre Q en la subespecie ibérica de ciervo rojo (*Cervus elaphus hispanicus*) en una reserva de caza cerrada sin contacto con ganado doméstico.

Seroprevalence of leptospirosis, brucellosis, and Q fever in a wild red deer (*Cervus elaphus*) population kept in a fenced reserve in absence of contact with livestock.

El objetivo de este estudio fue estimar la seroprevalencia de anticuerpos frente a *Brucella* spp., *C. burnetii* y *Leptospira* spp., enfermedades bacterianas zoonóticas, en la subespecie ibérica de ciervo rojo (*Cervus elaphus hispanicus*) en la reserva nacional de caza Los Quintos de Mora, con vallado perimetral, caza controlada y sin contacto con ganado doméstico en los últimos 50 años. El periodo de estudio fue entre los años 2007 y 2012 y se evaluó el efecto de la puesta en marcha de medidas de gestión y la influencia de diferentes factores de riesgo (edad, sexo y gestación y, finalmente, se investigó la presencia de ADN de *Leptospira* en muestras recolectadas de placenta y fetos procedentes de hembras gestantes seropositivas.

- **Objetivo 3:**

Vigilancia epidemiológica de los principales patógenos bovinos de etiología vírica en una población cerrada de ciervo rojo (*Cervus elaphus*): virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), el herpesvirus bovino 1 (BoHV-1), el virus de la lengua azul (BTV) y el virus de Schmallenberg (SBV).

Surveillance for viral cattle pathogens in a closed red deer (*Cervus elaphus*) population evidences bovine viral diarrhoea virus (BVDV), bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) related alphaherpesvirus and blue tongue virus (BTV) circulation.

El objetivo de este estudio fue evaluar la prevalencia de los alfaherpesvirus relacionados con el BoHV-1, del BVDV, BTV y SBV en una población de ciervo rojo (*Cervus elaphus*) en ausencia de ganado durante varias décadas. De igual forma a los estudios anteriores, se evaluaron tanto el efecto de la puesta en marcha de medidas de gestión entre los años 2007 y 2012, como los diferentes factores de riesgo (la edad, el sexo y la gestación). Finalmente, se investigó el posible impacto de la infección por alfaherpesvirus relacionados con el BoHV-1 en la gestación en las hembras preñadas seropositivas mediante la búsqueda de lesiones compatibles con la infección en tejidos diana fetales y en la placenta.

CAPÍTULO IV

Resultados

4.1. Efecto de los diferentes ecosistemas y prácticas de gestión en las infecciones por *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en los rumiantes silvestres de España

DOI: 10.7559/2015-07-176

Journal of Wildlife Diseases, 52(2), 2016, pp. 293–300
© Wildlife Disease Association 2016

EFFECT OF DIFFERENT ECOSYSTEMS AND MANAGEMENT PRACTICES ON *TOXOPLASMA GONDII* AND *NEOSPORA CANINUM* INFECTIONS IN WILD RUMINANTS IN SPAIN

José M. San Miguel,¹ Daniel Gutiérrez-Expósito,² Adriana Aguado-Martínez,² Elena González-Zotes,² Juana Pereira-Bueno,³ Mercedes Gómez-Bautista,² Pedro Rubio,³ Luis M. Ortega-Mora,² Esther Collantes-Fernández,² and Gema Álvarez-García^{2,4}

¹ Zoetis, Av. Europa 20B, Alcobendas, 28108 Madrid, Spain

² Salud Veterinaria y Zoonosis, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

³ Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, University of León, 24071 León, Spain

⁴ Corresponding author (email: gemaga@ucm.es)

RESUMEN

Toxoplasma gondii y *Neospora caninum* son dos de los principales protozoos que causan aborto en pequeños rumiantes y bovinos domésticos, respectivamente, y también parasitan una amplia variedad de fauna silvestre. Se han realizado numerosos estudios serológicos en rumiantes silvestres de todo el mundo. Sin embargo, se desconoce la influencia de los diferentes ecosistemas y el efecto de las prácticas de gestión medioambiental en reservas cinegéticas en la prevalencia de estas infecciones. En este trabajo se ha estudiado la prevalencia de anticuerpos frente a *T. gondii* y *N. caninum* en rumiantes silvestres de cuatro reservas nacionales: tres reservas abiertas en el noroeste de España (Añares, Mampodre y Riaño) y una reserva cercada en el centro de España (Los Quintos de Mora) entre los años 2007 y 2012. Se recolectaron sueros de corzos (*Capreolus capreolus*) en Añares y junto con sueros de rebecos (*Rupicapra rupicapra*) en Mampodre y Riaño (ambas especies), mientras que los sueros de ciervos (*Cervus elaphus*) solo se recolectaron en Los Quintos de Mora. Los resultados de las pruebas de inmunofluorescencia (IFI) mostraron una prevalencia de anticuerpos frente a *T. gondii* significativamente mayor en el ciervo (13%; 17/131) que en el corzo (2%; 5/228) y en el rebeco (4%; 6/149) ($P < 0.05$, Fisher's exact test). Además, los anticuerpos específicos frente a *N. caninum* solo se detectaron en el 1% de los animales (ciervo: 2/131; corzo: 2/228; rebeco: 2/149). Las medidas de gestión (reducción del censo de ciervos y gestión de pastos naturales) se pusieron en práctica en la reserva Los Quintos de Mora y la prevalencia de anticuerpos frente a *T. gondii* en ciervos se redujo del 13% al 2% después de 5 años. Por el contrario, las prevalencias de anticuerpos frente a *N. caninum* fueron muy bajas (<2%) a lo largo de los años. Los resultados sugieren una escasa relevancia de los ciclos biológicos silváticos de ambos parásitos en las reservas de caza estudiadas, por lo que es improbable la interconexión entre los ciclos silváticos y domésticos. En cualquier caso, una explotación sostenible de los recursos naturales en las reservas cinegéticas puede ayudar a reducir la prevalencia de la infección por *T. gondii*.

4.1. Efecto de los diferentes ecosistemas y prácticas de gestión en las infecciones por *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en los rumiantes silvestres de España

Publicado en Journal of Wildlife Diseases, 52(2), 2016, pp. 293–300

EFFECT OF DIFFERENT ECOSYSTEMS AND MANAGEMENT PRACTICES ON *TOXOPLASMA GONDII* AND *NEOSPORA CANINUM* INFECTIONS IN WILD RUMINANTS IN SPAIN

José M. San Miguel,¹ Daniel Gutiérrez-Expósito,² Adriana Aguado-Martínez,² Elena González-Zotes,² Juana Pereira-Bueno,³ Mercedes Gómez-Bautista,² Pedro Rubio,³ Luis M. Ortega-Mora,² Esther Collantes-Fernández,² and Gema Álvarez-García^{2,4}

1 Zoetis, Av. Europa 20B, Alcobendas, 28108 Madrid, Spain

2 Salud Veterinaria y Zoonosis, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

3 Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, University of León, 24071 León, Spain

4 Corresponding author (email: gemaga@ucm.es)

ABSTRACT

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are two major abortifacient protozoans in domestic small ruminants and cattle, respectively, and they also parasitize a wide range of wildlife. Numerous serosurveys have been conducted in wild ruminants worldwide. However, the potential effect of different ecosystems and management practices on these infections has not been investigated. We studied the prevalence of antibodies to *T. gondii* and *N. caninum* in wild ruminants between 2007 and 2012 from four national wildlife reserves: three open space reserves in northwest Spain (Ancares, Mampodre, and Riaño) and a fenced reserve in central Spain (Quintos de Mora). Sera from roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*) were collected in Ancares (roe deer), Mampodre (both species), and Riaño (both species), whereas red deer (*Cervus elaphus*) sera were collected only in Quintos de Mora. The results of immunofluorescence antibody tests showed a *T. gondii* antibody prevalence significantly higher in red deer (13%; 17/131) than in roe deer (2%; 5/228) and chamois (4%; 6/149) ($P < 0.05$, Fisher's exact test). Moreover, *N. caninum*-specific antibodies were only detected in 1% of animals (2/131 red deer, 2/228 roe deer, and 2/149 chamois). Management measures were implemented in the Quintos de Mora reserve and *T. gondii* antibody prevalence in red deer decreased from 13% to 2% after 5 yr. In contrast, *N. caninum* antibody prevalences were very low ($< 2\%$) over the years. The results suggest a low frequency of sylvatic life cycles in the hunting reservations studied, so interconnection between sylvatic and domestic life cycles is unlikely. Regardless, a sustainable exploitation of natural resources in wildlife reserves may help to reduce the prevalence of *T. gondii* infection.

Key words: Chamois, management measures, *Neospora caninum*, red deer, roe deer, seroprevalence, Spanish wildlife reserves, *Toxoplasma gondii*.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are closely related intracellular protozoan parasites distributed worldwide (Bojar and Szymanska 2010; Dubey and Schares 2011). They have heteroxenous life cycles, in which the definitive hosts are domestic cats (*Felis catus*; Frenkel et al. 1970) and other wild felids for *T. gondii* (Tenter et al. 2000) and dogs (*Canis lupus familiaris*), grey wolves (*Canis lupus*), coyotes (*Canis latrans*), and dingoes (*Canis lupus dingo*) for *N. caninum*. A wide range of warm-blooded animals can act as intermediate hosts of *T. gondii*, whereas *N. caninum* infects a more limited range of intermediate hosts (reviewed by Dubey and Schares 2011). *Toxoplasma gondii* and *N. caninum* infections are causes of reproductive failure in small ruminants (Masala et al. 2007) and cattle (Dubey 2003), respectively, with significant economic impact. Moreover, *T. gondii* is an important zoonosis, and up to a third of the world's human population may be infected. Infection is mainly acquired by ingestion of food or water that is contaminated with oocysts shed by cats or by eating under-cooked or raw meat containing tissue cysts (Dubey and Jones 2008).

There is increased interest in investigating the role of wild ruminants in sylvatic life cycles. European wild ruminant populations have grown considerably (Apollonio et al. 2010). Studies in northern Spain have shown evidence of a large resurgence in ungulate populations (Gortázar et al. 2000). This is most likely due to the abandonment of agricultural fields, the advance of forests, and the implementation of hunting

management practices (Acevedo et al. 2005). Hunting is a relevant and traditional activity with an important economic impact. Game is consumed by hunters and their families and is sold to some restaurants and stores. Consequently, game consumption and the handling of wild animals by hunters are potential sources of *T. gondii* infection to humans (Tenter et al. 2000). Jenkins et al. (2015) brought *T. gondii* to be the attention of the One Health community. In addition, the European Food Safety Authority (EFSA 2006) cited a need to improve the surveillance and monitoring of *T. gondii* in animals and food products for human consumption to better evaluate the risk of toxoplasmosis in member states. Antibodies to *T. gondii* and *N. caninum* have been reported in various wild ruminant species, suggesting widespread exposure (Dubey and Jones 2008; Dubey and Schares 2011). In Spain, such information remains relatively scarce, and some studies were based on limited sample sizes and areas (Gauss et al. 2006; Gamarra et al. 2008; Panadero et al. 2010). However, the detection of specific antibodies in red deer (*Cervus elaphus*), Barbary sheep (*Ammotragus lervia*), roe deer (*Capreolus capreolus*), and Iberian wild goat (*Capra pyrenaica hispanica*) suggests that sylvatic and domestic life cycles may be interconnected and impact the prevalence of both infections in cattle and small ruminant herds (Panadero et al. 2010; García-Bocanegra et al. 2012; Almería and López-Gatius 2013; García-Bocanegra et al. 2013). The potential effect of different ecosystems and management practices on both infections has not been investigated.

We measured the prevalence of antibodies to *T. gondii* and *N. caninum* in Spanish red deer, roe deer, and chamois (*Rupicapra rupicapra*) in four national wildlife reserves with controlled hunting. We repeated the serosurvey in the only fenced reserve 5 yr after implementation of management measures and noted the effect of management changes on prevalence. We also evaluated age and sex data in red deer.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

Toxoplasma gondii and *N. caninum* antibody surveys were conducted in red deer, roe deer, and chamois in 2007 from four Spanish hunting reserves (Quintos de Mora, Riaño, Mampodre, and Ancares) under different management systems. Quintos de Mora (39024'23" N, 404'19" W) is a fenced and controlled hunting national reserve where there are no domestic animals. Riaño (43020'0" N, 5043'0" W), Mampodre (4302'21" N, 507'1" W), and Ancares (42050'35" N, 6049'54" W) are open hunting reservations, where wild animals may share pasture with domestic animals including cattle, sheep, and goats. Roe deer were sampled in Riaño, Mampodre, and Ancares; chamois were sampled in Riaño and Mampodre; and red deer were only sampled in Quintos de Mora (Fig. 1 and Table 1).

After this first sampling, we implemented changes in the management system of the Quintos de Mora reserve and repeated the serosurvey in the red deer population 5 yr later (2012). The new management system included a reduction in the red deer population from 2,500 to 1,700 animals via controlled selective hunting. In addition, we replaced traditional food supplementation in fixed troughs during the dry season with the opening of fenced grazing areas to guarantee sufficient food.

Blood samples were collected directly from the bullet wound, jugular vein, or heart when the thoracic cavity was opened during necropsies. Blood was collected in plastic tubes and serum was obtained after centrifugation and stored at <20 C until

analysis. Both anti-*T. gondii* and -*N. caninum* specific antibodies were detected by the immunofluorescence antibody technique (IFAT) as described in the upcoming text. Age and sex data were recorded for red deer from the Quintos de Mora reserve. Age was determined by morphologic and metric variables of the canine teeth (d’Errico and Vanhaeren 2002).

Sampling areas

Quintos de Mora is a fenced hunting reservation of 6864 ha in the province of Toledo (central Spain; Fig. 1) that comprises an extended plain at 800 m above sea level and a mountainous area that reaches 1,200 m. It is a Mediterranean scrubland with holm oak (*Quercus ilex*) as the most representative tree. The climate is mild (average temperature of the coldest month between 0 C and 18 C) with a hot (average temperature in the hottest month above 22 C) and dry summer, and the humid season mainly comprises winter (“Csa” following the climate classification of Köppen- Geiger) (Kottek et al. 2006).

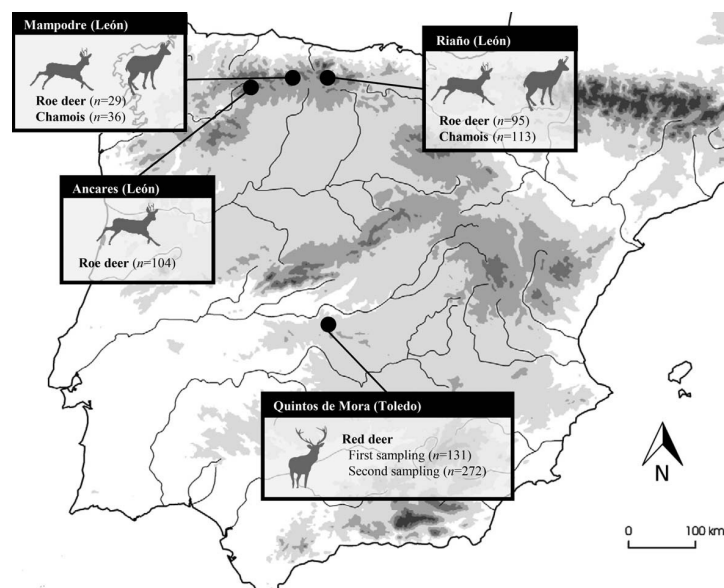


FIGURE 1. Location of the Spanish national reserves where serum samples were collected from red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus capreolus*), and chamois (*Rupicapra rupicapra*) to determine the prevalence of antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in 2007 (first sampling) and 2012 (second sampling).

The representative mammals are game species, mainly red deer and wild boar (*Sus scrofa*) but also some fallow deer (*Dama dama*), roe deer, and wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), as well as carnivores including foxes (*Vulpes vulpes*), wild cats (*Felis sylvestris*), genets (*Genetta genetta*), and several mustelid carnivores such as badger (*Meles meles*), polecat (*Mustela putorius*), beech marten (*Martes foina*), and weasel (*Mustela nivalis*).

Riaño, Mampodre, and Ancares are located in northwestern Spain in the province of León (Fig. 1). They are mountainous regions with a cold climate (average temperature of the coldest month below 0 C) and a mild (average temperature in the hottest month below or equal to 22 C and with 4 mo or more with average temperatures above 10 C) and dry summer (“Dsb” following the climate classification of Köppen-Geiger). Areas with the lowest altitude have a mainly mild climate (average temperature of the coldest

month between 0 C and 18 C) with a mild and dry summer (“Csb” based on climate classification of Köppen-Geiger) (Iberian climate Atlas, Agencia Estatal de Meteorología). In these areas the humid season comprises autumn, winter, and spring. The highest peaks reach 2,000 m. The flora is characterized by broad grazing areas and woodland with beeches (*Fagus sylvatica*), holly trees (*Ilex aquifolium*), and birch (*Betula celtiberica*), among others. Five game mammals can be found in these regions: red deer, roe deer, chamois, Iberian ibex (*Capra pyrenaica hispanica*), and wild boar. The carnivore species are mainly the wild cat and some mustelids, such as the European pine marten (*Martes martes*) and the beech marten. The brown bear (*Ursus arctos arctos*) can be found in Ancares and Riaño, and the wolf is also frequently found.

Parasites and antigen preparation

Toxoplasma gondii tachyzoites of the Tg-Me 49 strain and *N. caninum* tachyzoites of the Nc-1 isolate were maintained in vitro by serial passages in Marc145 cells as described by Pérez-Zaballos et al. (2005). The tachyzoites from cell culture were scraped, passed by 21-gauge needles, and harvested by centrifugation. The pellet of tachyzoites was washed twice and counted in a Neubauer chamber, excluding nonviable tachyzoites by trypan blue vital dye. The tachyzoites were finally resuspended at a final concentration of 107/mL. For IFATs, formaldehyde was added to the tachyzoite suspension at a final concentration of 0.2%, and formalin-fixed tachyzoites were aliquoted and stored at 4 C until use.

Immunofluorescence antibody tests

Sera were analyzed by both *T. gondii* and *N. caninum* tachyzoite-based IFAT tests in double serial dilutions starting at 1:50 following the method of Fernández-García et al. (2009). The fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-deer immunoglobulin G (IgG) antibody conjugate (02-31-06 KPL, Gaithersburg, Maryland, USA) at a 1:30 dilution for red deer and roe deer and an FITC-labeled anti-bovine IgG (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) at a 1:150 dilution for serum samples from chamois (Gutiérrez-Expósito et al. 2013) were used as secondary antibodies. The slides were examined under a fluorescence microscope (Nikon-Optiphot 229992, Tokyo, Japan). Samples were considered positive for *N. caninum* and *T. gondii* if sera had specific fluorescence at a dilution of $\geq 1:100$ (Stieve et al. 2010); a specific fluorescence at 1:50 was considered negative.

Data analysis

The prevalence of antibodies to *T. gondii* and *N. caninum* was estimated from the ratio of positive samples (titer ≥ 100) to the total number of samples. Prevalences in red deer were calculated according to age and sex. Animals were classified as juveniles (< 1 yr), young adults (1–2 yr), and adults (> 2 yr). In roe deer and chamois, only geographic location was obtained. Significance of differences in prevalences was tested by Fisher’s exact or χ^2 tests, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

On first sampling, *T. gondii* antibody prevalence was significantly higher in red deer (13%; 17/131) than in roe deer (2%; 3/228) and chamois (4.0%; 6/149) ($P < 0.05$, Fisher’s exact test), with titers that ranged from 100 to 800 (Table 1). The great majority of titers were 100 or 200; only one titer (in a roe deer) was 800. Titers of positive chamois were 100 to 400. *Neospora caninum*-specific antibody was detected in 6 of 508 (1%)

samples analyzed from red deer (2/131), roe deer (2/228), and chamois (2/149); all with titers of 100.

No differences in the prevalence of antibodies to either *T. gondii* or *N. caninum* were found between northwest and central Spain reserves ($P>0.05$, χ^2 test). There were no significant differences in antibody prevalences among the Ancares, Mampodre, and Riaño reserves for roe deer ($P>0.05$, χ^2 test) nor between the Mampodre and Riaño reserves for chamois ($P>0.05$, Fisher’s exact test).

Table 1. Seroprevalence of *T. gondii* and *N. caninum* in red deer, roe deer and chamois from four national reserves and IFAT titer distribution in seropositive animals.

Animal species	Parasite	Reserve*				IFAT titers**			
		Quintos de Mora	Ancares	Mampodre	Riaño	1:100	1:200	1:400	1:800
Red deer†	<i>T. gondii</i>	12.9% (17/131)				70.6% (12/17)	23.5% (4/17)	5.9% (1/17)	---
	<i>N. caninum</i>	1.5% (2/131)				100% (2/2)	---	---	---
Roe deer	<i>T. gondii</i>		0.0% (0/104)	3.4% (1/29)	4.2% (4/95)	80% (4/5)	---	---	20% (1/5)
	<i>N. caninum</i>		1.9% (2/104)	0.0% (0/29)	0.0% (0/95)	100% (2/2)	---	---	---
Chamois	<i>T. gondii</i>			5.5% (2/36)	3.5% (4/113)	33.3% (2/6)	50.0% (3/6)	16.7% (1/6)	---
	<i>N. caninum</i>			0.0% (0/36)	1.7% (2/113)	100% (2/2)	---	---	---

* % (No. Positive / No. Tested)

**The percentage of IFAT titers of 1:100, 1:200, 1:400 and 1:800 were calculated over the total positive samples with IFAT titers $\geq 1:100$

† Results corresponded to the first sampling before the implementation of the new management measures

TABLE 1. Prevalence of (number positive/number tested) antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus capreolus*), and chamois (*Rupicapra rupicapra*) from four national reserves in Spain and immunofluorescent antibody test (IFAT) titer distribution in antibody-positive animals. Immunofluorescent antibody test titers are expressed as the highest dilution giving a positive test result. Results corresponded to the first sampling (2007) before the implementation of new management measures.

When the red deer population at Quintos de Mora was resampled after the implementation of new management measures, *T. gondii* antibody prevalence had decreased from 13% (17/131) to 2%, (5/272) in the second sampling ($P<0.05$, χ^2 test). Titers corresponded to 100 (3/5), 200 (1/5), and 400 (1/5). Antibodies against *N. caninum* in red deer did not change over the years, and low prevalences ($< 2\%$ were found in both samplings; 1.5% and 0.4% at the first and second samplings, respectively) ($P>0.05$, χ^2 test). In the second sampling only one red deer had an IFAT titer of 100.

No differences in the prevalences for *T. gondii* and *N. caninum* antibodies were found among age classes; $P>0.05$, χ^2 test) or sexes of red deer ($P>0.05$, χ^2 test; Table 2). In the second sampling *T. gondii* antibody-positive animals included 2/102 males and 3/170 females; only 1/107 females was *N. caninum* antibody-positive. One of 54, 1-yr-old animals was *T. gondii* antibody-positive; one of 37 1–2- yr-olds was *T. gondii* antibody-positive and one was *N. caninum* antibody-positive; three of 181 adults were *T. gondii* antibody-positive.

Table 2. Seroprevalence of *T. gondii* and *N. caninum* in red deer from Quintos de Mora reserve according to age and sex.

Variables and categories		<i>T. gondii</i> *	<i>N. caninum</i> *
Age	< 1 year	6.7% (2/30)	0.0% (0/30)
	1-2 years	17.6% (6/34)	0.0% (0/34)
	Adults (> 2 years)	13.4% (9/67)	2.9% (2/67)
Sex	Male	13.7% (10/73)	0.0% (0/73)
	Female	12% (7/58)	3.4% (2/58)

* % (No. Positive /No. Tested)

TABLE 2. Prevalence (% , number of positive/number tested) of antibody to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in red deer (*Cervus elaphus*) from Quintos de Mora reserve according to age and sex corresponding to the first sampling (2007).

DISCUSSION

Neospora caninum and *T. gondii* are two relevant abortifacients in domestic ruminants, and both infections are highly prevalent in Spain. Studies in wildlife suggested an inter-connection between the domestic and sylvatic life cycles (Almería and López-Gatius 2013). In this context, we studied the relevance of both sylvatic life cycles in wild ruminant species in three open and one fenced regional hunting reservations. Thus, a large number of red deer, roe deer, and chamois were tested for specific antibodies against *T. gondii* and *N. caninum*. In addition, the impact of a new management system implemented in the fenced hunting reserve (Quintos de Mora) on the prevalence rates of both protozoan infections was investigated in the red deer population. Antibody prevalences were low for both parasitic infections regardless of animal species, geographic region, and the sampling period studied. Remarkably, prevalences reported here were significantly lower than those reported in other European areas, including Spanish ecosystems (Gaffuri et al. 2006; Bartova et al. 2007; Gozdzik et al. 2010; De Craeye et al. 2011; Dubey and Schares 2011; Malmsten et al. 2011). In Spain, *T. gondii* antibody prevalences varied in red deer from 11.7% to 44.2% depending on geographic region (Gauss et al. 2006). For roe deer, Gamarra et al. (2008) reported 39.2% prevalence by modified agglutination test (MAT) and found significant differences between coastal and arid habitats, with high and low roe deer densities, respectively. In chamois, 20% antibody prevalences from northern Spain (Asturias) were also found (Gauss et al. 2006). In a serosurvey of *N. caninum* infection in red deer and roe deer by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in central and southern Spain Almería et al. (2007) reported prevalences <12%.

However, it is difficult to compare studies due to differences in habitat, presence of domestic or wild definitive hosts, climate and soil, experimental designs, and serologic techniques. The most commonly used techniques in *N. caninum* and *T. gondii* serodiagnosis are MAT, ELISA, and IFAT. Due to the lack of sensitivity and specificity data on these tests when using sera from wild ruminants, we selected the conservative cut-off titer of 100 as used by Stieve et al. (2010). In addition, we chose the same serologic technique and cut-off for both parasite species to make the results more comparable. In this scenario, a widely accepted diagnostic procedure should be highly recommended in order to better know the impact of these parasitic diseases in wildlife (Donahoe et al. 2015).

The low prevalences detected in our study, especially in the three open hunting reservations, were unexpected given that both parasitic infections are highly prevalent in domestic ruminants. Bovine neosporosis is currently the greatest cause of infectious abortion in Spanish cattle, and the prevalence in cattle is still significantly higher in north-western Spain compared to other European countries (Bartels et al. 2006; Eiras et al. 2011). Similarly, *T. gondii* infection is wide spread in small domestic ruminants. In particular, close to the Mampodre, Ancares, and Riaño reserves, individual infection prevalences of 46.1% and 54.5% were found in sheep (*Ovis aries*) and goats (*Capra aegagrus hircus*), respectively (Ortega-Mora et al. 2006), whereas *T. gondii* infection was diagnosed in 23.1% of the ovine aborted fetuses from different points of northern and ventral Spain (Pereira-Bueno et al. 2004). *Neospora caninum* infection also seems to play a role in abortions in small ruminants in Spain (Moreno et al. 2012; González-Warleta et al. 2014).

Our results showed that both sylvatic life cycles may not be relevant in the sampled regions, supported by the low antibody prevalences found (< 5%). Surprisingly, the highest *T. gondii* antibody prevalence (12.9%) was found in red deer in the first sampling in Quintos de Mora, a fenced area that prevents wildlife from contact with domestic ruminants, in contrast to the other three reserves, where domestic and wild ruminants share pastures. The prevalence significantly decreased to 2% after 5 yr, probably due to improved management of hunting resources in Quintos de Mora. In particular, natural vegetation grown in fenced areas (unlikely to be contaminated with oocysts) during the humid season was available for animals during the dry season instead of supplemental food (pellet feed) in fixed troughs to guarantee enough food supply. High animal density around fixed troughs may negatively affect animal health by favoring the spread of other infectious or parasitic diseases (e.g., helminth infections) and by contributing to stress-associated immunosuppression (Davidson et al. 2014). Moreover, the number of red deer per hectare was reduced by means of controlled selective hunting. Both measures ensured better optimization of natural resources and better preservation of Mediterranean forest, and might also explain the reduction of *T. gondii* antibody prevalence between samplings. As domestic cats are unlikely to be present in Quintos de Mora, prevalence rates might be explained by the existence of wild cats acting as the definitive host in this ecosystem (Lukesova and Literak 1998). Indeed, anti-*T. gondii*-specific anti-bodies were previously reported in wild cats in Spain (Sobrino et al. 2007).

There were no significant differences of prevalences of either infection with age or sex, which may be due to the low prevalences found. Previous authors found that *T. gondii* antibody prevalence increased with age due to the higher chance of being infected with oocysts from the environment. In our study the highest prevalences were found in animals >1 yr old. Moreover, we confirmed that in the natural environment, wild animals are more exposed to *T. gondii* than to *N. caninum* (Panadero et al. 2010; Malmsten et al. 2011), probably due to decreased frequency of horizontal transmission of *N. caninum*. Indeed, it has been widely postulated that *N. caninum* infection is mainly maintained by transplacental transmission *versus* the horizontal transmission of *T. gondii* through ingestion of food and water contaminated with sporulated oocysts (Gaffuri et al. 2006; Gamarra et al. 2008; De Craeye et al. 2011).

The antibody prevalences reported in open hunting reservations (Ancares, Mampodre, and Riaño), where wild ruminants may interact with domestic animals, were similarly low in roe deer and chamois regardless of different geographic characteristics.

These results could be due to the low density of felids in these sampled areas and the absence of human activity. In northwestern Spain, interaction between *N. caninum* domestic and sylvatic cycles might occur because *N. caninum* infection was detected in roe deer (13.7%), in cattle sharing pastures (Panadero et al. 2010), and in some wild carnivores (Sobrinho et al. 2008). However, in this study, antibody prevalence in roe deer was also very low. A shortage of definitive hosts, very low oocyst shedding and, subsequently, less frequent horizontal transmission could explain the low *N. caninum* prevalence in wild ruminants. However, high-to-moderate prevalences have been described in some Spanish carnivores that might be involved in the sylvatic life cycle (Gauss et al. 2006; Millán et al. 2009; Panadero et al. 2010).

In summary, we found a low frequency of sylvatic life cycles in all hunting reservations studied, indicating that an interconnection between sylvatic and domestic life cycles in open-space hunting reserves is unlikely. Despite low *T. gondii* antibody prevalences in these regions, there is still a potential risk of humans acquiring infection through game meat consumption. Finally, a sustainable exploitation of natural resources avoiding food supply has shown to be efficient in reducing the prevalence of *T. gondii* infection in wild ruminants.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by Salud Veterinaria y Zoonosis research group's resources. We thank Consejería de Agricultura, Medio Ambiente y Desarrollo Rural de Castilla la Mancha, and Consejería de Fomento y Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León for institutional authorization to collect the samples. We also thank Agustín Gutiérrez-Sierra, Carlos Rodríguez-Vigal, Angel Moreno Gómez, and staff of Quintos de Mora for their collaboration in sampling.

4.2. Seroprevalencia de leptospirosis, brucelosis y fiebre Q en una población silvestre de ciervo (*Cervus elaphus*) sin contacto con el ganado doméstico.

VECTOR-BORNE AND ZOOLOGICAL DISEASES
Volume 17, Number 10, 2017
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/vbz.2016.2105

Seroprevalence of Leptospirosis, Brucellosis, and Q Fever in a Wild Red Deer (*Cervus elaphus*) Population Kept in a Fenced Reserve in Absence of Contact with Livestock

Jose María San-Miguel Ayanz,^{1,*} Francisco Javier García-Peña,^{2,*} Paula García-Lunar,³
Luis Miguel Ortega-Mora,³ María José Ruano,² Gema Álvarez-García,³ and Esther Collantes-Fernández³

RESUMEN

La sanidad de la fauna silvestre es de interés para la sanidad pública y la sanidad animal porque los animales silvestres han sido identificados como importantes centinelas para la vigilancia de patógenos zoonóticos. En este trabajo se investigó la seroprevalencia de la infección por *Brucella* spp., *Coxiella burnetii* y *Leptospira* spp. en una población de ciervos en una reserva cercada con actividad de caza controlada en el centro de España y sin contacto con el ganado doméstico. El muestreo se realizó en dos periodos, antes y 5 años después de la implementación de nuevas medidas de gestión mediambiental, incluida una reducción de la población de ciervos en la reserva. Además, se analizó la presencia de ADN de *Leptospira* en muestras fetales y placentarias de las hembras preñadas seropositivas. No se detectaron anticuerpos frente a *Brucella* y *Coxiella*. La seroprevalencia de *Leptospira* fue del 9,4% (13/137) en el primer muestreo, para los serovares Canicola y Panama. Cinco años más tarde, la prevalencia aumentó hasta el 38,5% (97/252), siendo Pomona el único serovar detectado. Los animales mayores de 2 años (50%; 70/140) fueron más propensos a ser seropositivos frente al serovar Pomona que los animales de ≤ 2 años (25.2%; 27/107; $p < 0,001$). No se detectó ADN de *Leptospira* en ninguna muestra analizada. En conclusión, el ciervo rojo silvestre en esta área sin contacto con el ganado parece no jugar un papel importante en el mantenimiento de *Brucella* spp. y *C. burnetii*. La alta seroprevalencia frente a *Leptospira* spp. serovar Pomona podría indicar un riesgo para las personas en estrecho contacto con estos animales. En consecuencia, se desconoce si el ciervo podría suponer un riesgo para la infección del hombre. Teniendo en cuenta que el jabalí podría ser la fuente de infección para el ciervo, se debe investigar el papel del jabalí en la propagación de la leptospirosis y el riesgo para la infección del hombre.

4.2. Seroprevalencia de leptospirosis, brucelosis y fiebre Q en una población silvestre de ciervo (*Cervus elaphus*) sin contacto con el ganado doméstico.

Publicado en VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES Volume 17, Number 10, 2017, pp. 692–697

Seroprevalence of Leptospirosis, Brucellosis, and Q Fever in a Wild Red Deer (*Cervus elaphus*) Population Kept in a Fenced Reserve in Absence of Contact with Livestock

Jose María San-Miguel Ayanz,^{1,*} Francisco Javier Garcia-Peña,^{2,*} Paula García-Lunar,³ Luis Miguel Ortega-Mora,³ María José Ruano,² Gema Álvarez-García,³ and Esther Collantes-Fernández³

1 ZOETIS, Madrid, Spain.

2 Laboratorio Central de Veterinaria de Algete, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Algete, Spain.

3 SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

*These authors contributed equally to this work.

Abstract

Wildlife health is of interest for public and animal health because wild animals have been identified as important sentinels for the surveillance for zoonotic pathogens. This work investigated *Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, and *Leptospira* spp. infection seroprevalence in a free-ranging red deer population. The study was conducted in a fenced reserve with controlled hunting activity in central Spain with animals that did not have any contact with livestock. Sampling was performed at two time points before and 5 years after the implementation of new management measures, including a reduction in the red deer population in the reserve. In addition, the presence of *Leptospira* DNA was tested in placental and fetal samples from seropositive pregnant animals. Antibodies against *Brucella* and *Coxiella* were not detected in any sample. The seroprevalence of *Leptospira* was 9.4% (13/137) in the first sampling for serovars Canicola and Panama. Five years later, the prevalence rose to 38.5% (97/252) with Pomona, the only serovar detected. Animals older than 2 years (50%; 70/140) were more likely to be Pomona seropositive than animals ≤ 2 years old (25.2%; 27/107; $p < 0.001$). *Leptospira* DNA was not detected in any sample tested. In conclusion, wild red deer in this area without contact with livestock seem not to play an important role in *Brucella* spp. and *C. burnetii* maintenance. The high seroprevalence of *Leptospira* spp. serogroup Pomona could indicate a risk for people with narrow contact with these animals, but the carrier status was not assessed. Consequently, it is unknown if red deer would represent a risk for human infection. Considering that wild boar could be the source of infection to red deer, the role of wild boar in the spread of leptospirosis and the risk for human infection should be investigated.

Keywords: *Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Leptospira*, red deer, seroprevalence, zoonosis

Introduction

Wildlife health is of interest in terms of conservation and because wild animals are important sentinels for the surveillance for zoonotic pathogens (Rabinowitz et al. 2006; Halliday et al. 2007). In Spain, the red deer (*Cervus elaphus*) has notably increased its population size (Acevedo et al. 2008). This finding is most likely due to the abandonment of fields, the advance of forests, and the implementation of hunting management practices (Acevedo et al. 2005). The current range of the red deer extends throughout Spain with higher densities in the southwest, where it is one of the most culturally and economically important hunting species (Carranza 2004). Exposure of hunters to wildlife during game carcass dressing has been proposed as a potential zoonotic risk (Bengis et al. 2004). In this context, brucellosis, Q fever, and leptospirosis are important zoonotic bacterial diseases. Brucellosis is caused by bacteria of the genus *Brucella* (Bengis et al. 2004), *Brucella abortus* and *B. melitensis* being the species most regularly transmitted between wild and domestic ungulates (Bengis et al. 2004; Van Campen and Rhyen 2010). Q fever is a zoonosis with a worldwide distribution that is caused by the Gram-negative intracellular bacterium *Coxiella burnetii* (González-Barrio et al. 2015). A high prevalence of this pathogen in deer and the deer-human contact may represent an important risk factor for human infection, especially in areas where a significant percentage of animals have been exposed to the bacterium (Kirchgesner et al. 2013). Leptospirosis is a worldwide zoonotic infection that occurs in domestic and wild mammals (Bharti et al. 2003) and is considered one of the most important reemerging human health hazards by the OIE (Bengis et al. 2004). Among wildlife species, rodents

and wild boars are considered to be important reservoirs for leptospirosis (Bharti et al. 2003). Finally, these diseases are also important causes of reproductive failure in domestic ruminants (Bengis et al. 2004; Gortázar et al. 2007, García-Ispierto et al. 2014). As a result of this situation, surveillance studies that assess the role that red deer may play in the maintenance of different zoonotic pathogens in Spain could have important contributions to the prevention and control programs. The aim of this work was to determine the seroprevalence of *Brucella* spp., *C. burnetii*, and *Leptospira* spp. infections in a wild red deer population kept in a fenced reserve with controlled hunting activity. The animals did not have any contact with livestock for several decades. The samplings were performed at two different time points before and 5 years after the implementation of several management measures. The influence of different risk factors (age, gender, and pregnancy) was also evaluated. Finally, the presence of *Leptospira* DNA was investigated in placental and fetal collected samples from seropositive pregnant animals.

Materials and Methods

Sampling area

The samplings were performed in the Quintos de Mora reserve, which is a fenced hunting area of 6864 ha located in the province of Toledo (Central Spain) that extends on a plain 800 meters above sea level (m.a.s.l.) and a mountainous area that reaches 1200 m.a.s.l. The climate is Mediterranean with rather cold winters (average temperature of the coldest month between 0°C and 18°C) and hot (average temperature in the hottest month above 22°C) and dry summers (“Csa” following the climate classification of Köppen-Geiger) (Iberian climate Atlas, AEMET). The most representative mammals are the hunting species red deer, wild boar (*Sus scrofa*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*). Livestock has not been present in Quintos de Mora for at least five decades.

Experimental design

The seroprevalence of *Brucella* spp., *C. burnetii*, and *Leptospira* spp. was studied in red deer samples collected in 2007 and 2012 during the hunting season (from January to March). Changes in the management system of the Quintos de Mora reserve were implemented during this 5-year period. The new management system included a reduction in the red deer population, which decreased from 2500 to 1700 animals through controlled selective hunting. The number of roe deer and fallow deer present in “Quintos de Mora” is below 100 animals and the census has not varied over time. In addition, traditional food supplementation done in fixed troughs during the dry season was replaced by opening fenced grazing areas to guarantee enough food supply.

Animals were hunted and blood samples were opportunistically collected from the culled animals. A total of 137 and 252 samples were collected in the first and second samplings, respectively. The number of animals sampled was representative, corresponding to 5.4% (137/2500) and 14.8% (252/1700) of the red deer population from the area, respectively. Blood was collected by heart puncture in plastic tubes and sent to the laboratory at 4°C. In the laboratory, serum samples were collected after centrifugation and stored at -80°C before analysis. *Brucella* spp., *C. burnetii*, and *Leptospira* spp.-specific antibodies were detected using the Rose Bengal Test, ELISA, and Microscope Agglutination Test (MAT), respectively, as described below. The ages of the free-ranging deer were determined using canine morphological and metric variables (D’Errico and

Vanhaeren 2002), and the animals were classified into the following age groups: animals ≤ 2 and > 2 years. Gender and pregnancy data were annotated when possible. In pregnant animals, a sample was collected from the placenta and the fetal brain, lung, kidney, and liver tissues, or the whole fetus (depending on the fetus size). All samples were stored at -20°C before analysis.

This study did not involve the purposeful killing of animals. All samples originated from legally hunted dead wildlife.

Rose Bengal Plate agglutination test

To detect antibodies against smooth *Brucella* spp., serum samples were analyzed using the Rose Bengal Test according to the OIE recommendations (OIE 2015).

ELISA

The LSIVetTM Ruminant Q Fever commercial test (LSI, Lissieu, France) was employed for the detection of specific antibodies against *C. burnetii*. The manufacturer's instructions were followed for the testing and interpretation of results. *C. burnetii* ELISA was validated using 23 positive and 23 negative reference red deer sera from a previous study (González-Barrio et al. 2015), and observed a perfect concordance (Cohen's kappa coefficient = 1) (data not shown).

Microagglutination test

The test was performed at the “Laboratorio Central de Veterinaria” (Algete, Madrid, Spain), which is the Spanish reference laboratory for leptospirosis, using the following live strains of *Leptospira*: *L. borgpetersenii* serovars Australis, Ballum, Bataviae, Castellonis, Djasiman, Hardjo, Javanica, and Tarassovi; *L. interrogans* serovars Autumnalis, Bratislava, Canicola, Copenhageni, and Pomona; *L. kirschneri* serovars Cynopteri and Grippotyphosa; *L. noguchii* serovars Louisiana and Panama; and *L. weilii* serovar Sarmin. All strains were originally supplied by the Veterinary Research Laboratories (Stormont, Belfast, United Kingdom) with the exception of the strains of serovars Castellonis, Djasiman, and Panama, which came from the National Laboratories Services (Ames, IA).

The strains were cultured in a liquid medium with Tween 80/40-bovine serum albumin (Ellis and Thiermann 1986), incubated at 29°C , and used after 4–8 days. The concentration of the antigens used for the test was adjusted to a transmittance of 60–70% measured at a 400nm wavelength. The sera were initially examined at a 1:30 dilution against each of the 18 serovars. Sera with some degree of agglutination activity at the 1:30 dilution were retested against each serovar to which they reacted using 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000, and 1:30.000 dilutions. Any serum sample for which approximately $\geq 50\%$ of the leptospires were agglutinated at a 1:100 dilution was classified as positive. The final titer was the highest dilution of the serum at which $\geq 50\%$ or more of the leptospires were agglutinated. A reference antiserum (National Veterinary Services Laboratories) and positive and negative controls were included in each assay.

Leptospira real-time polymerase chain reaction

A total of 22 pregnant females with a positive MAT *Leptospira* spp. result were selected in the second sampling. Placental and fetal samples were thawed. Total DNA was extracted separately from the placental and pooled fetal tissues (using the BioSprint 96 DNA Blood + Buffer ATL Kit (Qiagen GmbH, Germany) following the

manufacturer’s instructions. Real-time PCR was performed according to the previously published protocol (Stoddard 2013); negative and positive extraction controls were included in each assay.

Data analysis

Apparent prevalence rates according to gender, pregnancy status, and age were organized in contingency tables and the data were analyzed using the chi-squared or Fisher exact test (Table 1). Risk factors were also studied by estimating the odds ratios (OR). Age between samplings was compared by Student’s t-test. p Values < 0.05 were considered statistically significant.

TABLE 1. RISK FACTORS RELATED TO SEROPOSITIVITY AGAINST *LEPTOSPIRA* SPP. IN RED DEER

Factor	Sampling	Category	<i>Leptospira</i> spp. seroprevalence		
			No. positive/ no. tested (%)	95% CI	OR (95% CI); p-value
Age ^a	First sampling	≤2 years	7/54 (12.9)	4.1–21.8	0.61 (0.19–1.93); p=0.58
		>2 years	6/72 (8.3)	2.0–14.6	
	Second sampling	≤2 years	27/107 (25.2)	17.3–33.2	2.96 (1.71–5.12); p=0.0001
		>2 years	70/140 (50)	41.9–57.9	
Sex ^b	First sampling	Male	7/66 (10.6)	3.3–17.9	0.95 (0.3–3.02); p=0.83
		Female	6/61 (9.8)	2.5–17.2	
	Second sampling	Male	36/98 (36.7)	27.4–46.0	1.13 (0.67–1.9); p=0.74
		Female	61/154 (39.6)	32.1–47.0	
Pregnancy status ^c	First sampling	Pregnant	0/5 (0)	0.0–45.0	0.29 (0.01–5.56); p=0.5
		Nonpregnant	6/49 (12.2)	3.2–21.0	
	Second sampling	Pregnant	35/86 (40.7)	30.6–50.8	1.25 (0.63–2.4); p=0.47
		Nonpregnant	22/62 (35.5)	23.7–47.2	

^aAge data were not recorded for 11 and 5 animals in the first and second sampling, respectively.

^bSex data were not recorded for 10 animals in the first and second sampling.

^cPregnancy status data were not recorded for 83 and 104 animals in the first and second sampling, respectively.

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

Results

Prevalence and risk factor analysis

All samples were seronegative for *Brucella* spp. and *C. burnetii* in both samplings. The results showed that 9.4% of the samples (13/137; 95% confidence interval [CI]: 4.7–14.2) had antibodies against *Leptospira* spp. in the first sampling, whereas the apparent prevalence rate 5 years later rose to 38.5% (97/252; 95% CI: 32.9–44.0) (OR = 5.9; CI: 3.19–11.16; $\chi^2 = 35.39$; $p < 0.0001$). Most animals had antibodies against only one serovar. During the first sampling, 1.4% (2/137; 95% CI: 0.0–3.4) and 6.5% (9/137; 95% CI: 2.5–10.6) of the samples were only positive for serovars Canicola and Panama, respectively, and only two samples were positive for both serovars. Only serovar Pomona was found during the second sampling.

During the first sampling, no significant differences ($p > 0.05$) were observed between age, gender, and pregnancy status (Table 1). However, in the second sampling, animals > 2 years old (50%) were more likely to be Pomona seropositive than animals ≤ 2 years old (25.2%). No significant difference in the mean age was found between samplings ($p > 0.05$; Student’s t-test).

The antibody titers (Table 2) against serovar Canicola detected during the first sampling were 1:100 and 1:1000. In addition, most animals had a 1:100 titer against

serovar Panama. Interestingly, the two samples showing coinfections had MAT titers of 1:100 and 1:1000 against serovars Canicola and Panama, respectively. In contrast, most animals had antibody titers of 1:300, 1:100, and 1:1000 against serovar Pomona in the second sampling.

TABLE 2. DISTRIBUTION OF SPECIFIC ANTIBODY TITERS FOR THE DIFFERENT *LEPTOSPIRA* SPP. SEROVARS STUDIED IN WILD RUMINANTS DURING THE TWO SAMPLINGS

Serovar	1:100	1:300	1:1000
Canicola	50% (2/4) ^a	0	50% (2/4) ^a
Panama	90.9% (10/11) ^a	0	9% (1/11) ^a
Pomona	33% (32/97) ^b	46.4% (45/97) ^b	20.6% (20/97) ^b

^aData corresponding to the first sampling (2007).

^bData corresponding to the second sampling (2012).

Finally, *Leptospira* DNA was not detected in any of the placental and fetal samples from pregnant animals seropositive for *Leptospira* spp.

Discussion

Brucella spp., *C. burnetti*, and *Leptospira* spp. are important worldwide zoonotic pathogens; however, the role wildlife plays in maintaining these diseases outside of their target domestic animal or human populations is uncertain (Godfroid 2002, Arricau-Bouvery and Rodolakis 2005, Kirchgessner et al. 2013). In our study, antibodies against *Brucella* spp. were not detected in the sampled red deer population. This finding suggests that red deer seems not to be a suitable host for smooth *Brucella* species. Our results are in agreement with previous studies performed in red deer and other wild ruminants in different regions of Spain (Boadella et al. 2010, Muñoz et al. 2010, Serrano et al. 2011). Red deer also tested negative for *Brucella* in studies from the Czech Republic (Hubálek et al. 1993) and Central Italian Alps (Gaffuri et al. 2006). The sporadic cases reported in red deer were primarily associated with animals living with infected livestock (Hars et al. 2003). *C. burnetii* antibodies were not detected in our study; therefore, red deer could not play an important role in the sylvatic cycle of *C. burnetii* in this area. Previous Q-fever studies in wildlife in Spain showed a seroprevalence in wild red deer of 9.5% and 0% in the northern and southern areas, respectively (Ruiz-Fons et al. 2008). A seroprevalence of 3.8% in unmanaged red deer was found near the area where our hunting reserve was located (González-Barrio et al. 2015). Other studies performed in wild ruminants in Europe have shown an anti-*C. burnetii* antibody prevalence of 25% in red deer from the Czech Republic (Hubálek et al. 1993). These differences may depend on the living environments and higher contact with domestic ruminants.

The most remarkable results corresponded to the presence of *Leptospira* infections. However, the circulating serovars and the seroprevalence rates varied temporally. The first noticeable finding was a significant increase in the overall prevalence rate in the second sampling that rose from 9.4% to 38.5%. In agreement with the low prevalence rate found in the first sampling, a prevalence of 6.3% deer was reported in the central Italian Alps (Andreoli et al. 2014). In Spain, low seroprevalence rates were found in red deer from the southern (4.6%, Arenas et al. 1991) and northern (2.6%, Espi et al. 2010) areas. Although it is difficult to compare studies due to the

different cutoff values employed (usually 1:320), in our study, 27.2% of the samples had titers equal to or higher than 1:300.

Antibodies to serogroups Canicola (1.4%) and Panama (6.5%) were detected in the first sampling. Most of the positive red deer from the first sampling harbored antibodies against serovar Panama, whose origin is probably associated with carnivores and rodents. In France, a prevalence of 18% against this serovar has been reported in European polecat (*Mustela putorius*) (Moinet et al. 2010), this mustelid species is present in “Quintos de Mora” (Arija 2010). In the past, Pomona and Icterohaemorrhagiae were the most prevalent serovars described in red deer from southern Spain (León-Vizcaíno et al. 1994). In northern Spain, Pomona (1.6%), Bratislava (1.1%), Grippotyphosa (0.7%), Muenchen (2.6%), and Panama (1.2%) were found in red deer (Espí et al. 2010). These differences might be due to ecological and environmental factors that determine the geographic distribution of the maintenance hosts for each serovar. During the second sampling, the overall leptospirosis seroprevalence significantly increased. Only antibodies against the Pomona serogroup were detected, suggesting variability in exposure over time. Variations in prevalence could also reflect variations in the interaction between hosts and higher environmental contamination. Contact with some epidemiologically relevant species could have increased the risk of exposure of red deer to this pathogen. In the case of the Pomona serogroup, the most likely source of infection could be different rodent species and wild boar. *Leptospira kirschneri* serovar Mozdok (serovar belonging to serogroup Pomona) has been isolated from small rodents trapped in the vicinity of “Quintos de Mora” (Arent et al. 2017). Regarding the role of wild boar, it is known that there is an increase of wild boar populations across Europe. Mild winters, reforestation, intensification of crop production, supplementary feeding, and compensatory population responses of wild boar to hunting pressure might explain this population growth (Acevedo et al. 2007). Although the number of wild boars could not be determined in our study, hunting numbers could be used as indicator of animal numbers. In this study, a total of 35 and 211 wild boars were culled during the first and second sampling season, respectively, suggesting a higher number of wild boars. Moreover, in “Quintos de Mora,” the new management system included a reduction in the red deer population and the growth of natural vegetation available for animals during the dry season to guarantee enough food supply. These measures could have influenced the spread of Pomona, increasing aggregation, for example at feeding sites, since red deer and wild boar could share the same feeding areas (open fenced grazing areas) and the habit of walling in water pools in summer. Moreover, adult males mark their territory during the mating season and spread the infection. This contact and behavior most likely favors the transmission of the infection through contaminated pasture, mud, and water (Johnson et al. 2004, Barasona 2015). In addition, Pomona has been also retrieved in cattle and pigs near to “Quintos de Mora” area, being the most likely source of infection in wild boars (Arent et al. 2017). A high Pomona prevalence (38.1%) was detected in a fallow deer population in northern Spain together with high titers in wild boars after 5 years without positive reactors. Simultaneously, high titers (> 1:1280) were detected in several European wild boars in the region (Espí et al. 2010). Unfortunately, boar samples were not collected in our study. Because the wild boar population in Spain shows a tendency to grow, we can infer that wild boars may play an important role in leptospirosis transmission. Further studies on leptospirosis and the isolation of the infective agent are indicated in wild boars in this area. Accordingly, integrative management measures should be designed according to the wildlife populations present in the habitat (e.g.,

reduction of the current wild boar population).

When the risk factors associated with Pomona infection were studied, red deer older than 2 years showed a significantly higher seropositivity rate than young animals in the second sampling. This result was in agreement with other studies in domestic (Barwick et al. 1997, Ward et al. 2002, Balakrishnan et al. 2011) and wild animals (Vale-Gonçalves et al. 2015) because the possibility of contact with *Leptospira* increases over the animal lifespan. In our study, *Leptospira* DNA was not detected in placental and fetal tissues from seropositive pregnant animals. The most plausible explanation is that the pathogen was not located in these tissues or the antibody titers are due to past exposure to strains of the Pomona serogroup. Then, the infection was eliminated in a short period of time because red deer are probably an accidental host for serogroup Pomona (Ayanegui-Alcerreca et al. 2007). However, the lack of *Leptospira* DNA detection could be also due to the low pathogen numbers in placental and fetal tissues, which made it undetectable by the technique employed. Connections between red deer hind abortions and leptospirosis infections need to be clarified in the future.

Conclusions

In conclusion, free wild red deer without contact with domestic animals seem not to play an important role in *Brucella* spp. and *C. burnetii* maintenance in the studied area. A high seroprevalence of *Leptospira* spp. serogroup Pomona was detected, but the carrier status was not assessed in this study. Consequently, it is unknown if red deer would represent a risk for human infection. On the other hand, considering that wild boar could be the source of infection to red deer, the role of wild boar in the spread of leptospirosis and the risk for human infection should be investigated.

Acknowledgments

This study was financed by the SALUVET research group's own resources. Authors thank Consejería de Agricultura, Medio Ambiente y Desarrollo Rural de Castilla la Mancha, for the institutional authorization to collect the samples. Authors also thank Daniel Gutierrez-Expósito (Saluvet group), Jose María Blasco, Agustín Gutiérrez-Sierra, Carlos Rodríguez-Vigal, Angel Moreno Gómez, and staff of Quintos de Mora for their collaboration in the samplings.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

4.3. La vigilancia epidemiológica de los principales patógenos bovinos de etiología vírica demuestra la circulación del virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), el herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) y la circulación del virus de la lengua azul (BTV) en una población cerrada de ciervo rojo (*Cervus elaphus*).

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la seroprevalencia de las infecciones por los cuatro virus principales con repercusión en el fallo reproductivo de los rumiantes domésticos, el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), los herpesvirus relacionados con el herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), el virus de la lengua azul (BTV) y el virus de Schmallenberg (SBV) en una población de ciervo rojo. El estudio se realizó en una reserva vallada, con caza controlada, en el centro de España, en la cual los animales que no tuvieron un contacto previo con el ganado doméstico. Este estudio se llevó a cabo en 2007 y 2012 en el caso del BVDV y BoHV-1, antes y 5 años después de la implementación de nuevas medidas de manejo, incluyendo una reducción de la población de ciervos en la reserva. En el caso de SBV y BTV, el muestreo se realizó en 2012. Además, la placenta y los tejidos fetales de hembras preñadas y seropositivas frente al BoHV-1 (n=16) y sus fetos, correspondientes al segundo muestreo se analizaron mediante histopatología. Las tasas de seroprevalencia frente a la infección por el virus BVDV disminuyeron drásticamente del 10% en 2007 al 0% en 2012. Las seroprevalencias observadas frente a la infección por herpesvirus relacionados con el BoHV-1 apenas variaron entre los dos períodos de muestreo (21.6% y 20.2%), si bien no se detectaron focos necróticos con infiltración de leucocitos, ni cuerpos de inclusión compatibles con la infección por BoHV-1. Nuestros resultados sugieren que el ciervo pudo mantener la infección sin contacto previo con el ganado doméstico. Por otra parte, no se detectaron animales seropositivos frente al SBV, posiblemente porque este estudio se realizó antes de la detección de los primeros casos de esta infección vírica en rumiantes domésticos en España, después del primer brote detectado en Europa en 2011-2012. Finalmente, a pesar del pequeño número de animales seropositivos encontrados frente al BTV, los resultados han demostrado que el virus puede circular en la población de ciervos en ausencia del ganado doméstico. Por lo tanto, el ciclo selvático de BTV es clave en Europa y debe tenerse en cuenta en los planes de control y erradicación en áreas donde la climatología permite la presencia de vectores.

4.3. La vigilancia epidemiológica de los principales patógenos bovinos de etiología vírica demuestra la circulación del virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), el herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) y la circulación del virus de la lengua azul (BTV) en una población cerrada de ciervo rojo (*Cervus elaphus*).

Surveillance for viral cattle pathogens in a closed red deer (*Cervus elaphus*) population evidences bovine viral diarrhoea virus (BVDV), bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) related alphaherpesvirus and blue tongue virus (BTV) circulation.

San-Miguel Ayanz, J.M.¹, Gutiérrez-Expósito, D.², Collantes-Fernández, E.², Benavides-Silván, J.³, Ortega-Mora, L.M.², Álvarez-García, G.²

¹ ZOETIS, Av. Europa 20B, Alcobendas, 28108 Madrid, Spain

² SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain.

³ Departamento de Sanidad Animal, Universidad de León, Campus de Vegazana, León, Spain; Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Grulleros, León, Spain.

Corresponding author: Gema Álvarez García. SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34-91-3944095; fax: +34-91-3944098. E-mail: gemaga@ucm.es

Abstract

This work investigated the seroprevalence of the four main viral infections that cause reproductive failure in domestic ruminants, Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Bovine Alphaherpesvirus 1 (BoHV-1), Blue Tongue Virus (BTV) and Schmallenberg (SBV) in a free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) population. The study was conducted in a fenced reserve with controlled hunting activity in central Spain with animals that did not have any previous contact with livestock. This study was carried out in 2007 and 2012 in the case of the BVDV and alphaherpesviruses related to BoHV-1, before and 5 years after the implementation of new management measures, including a reduction in the red deer population in the reserve. In the case of SBV and BTV a unique sampling was performed in 2012. In addition, the placenta and fetal tissues of BoHV-1 seropositive pregnant hinds (n=16) and their fetuses collected in 2012 were analysed by histopathology. Seroprevalence rates against BVDV infection decreased drastically from 10% in 2007 to 0% in 2012. The seroprevalences observed against herpesvirus infection related to the BoHV-1 virus barely varied between the two sampling periods (21.6% and 20.2%). Neither necrotic foci with leucocyte infiltration nor inclusion bodies compatible with BoHV-1 infection were detected. Our results suggest that the red deer was able to maintain the infection without prior contact with livestock. In this study, no seropositive animals were detected against SBV, possibly because this study was carried out prior to the detection of the first cases of this viral infection in domestic ruminants in Spain following the first outbreak detected in Europe in 2011-2012. Despite the small number of seropositive animals found against the BTV, the results have shown that the virus can circulate in the red deer population in the absence of livestock. Therefore, the sylvatic cycle of BTV is key in Europe and should be taken into account in the control and eradication plans in areas where the weather conditions allow the presence of vectors.

Keywords: Bovine Viral Diarrhea Virus; Bovine Alphaherpesvirus 1; Schmallenberg; Blue Tongue Virus; red deer; Spain

1. Introduction

Red deer (*Cervus elaphus*) is one of the most abundant cervid species in Europe including Spain. The notably increment of red deer population size for the last decades (Apollonio et al. 2010; Delibes-Mateos et al. 2009) has raised concerns about the potential role that wild ruminants and, in particular, red deer, might play as reservoirs of pathogens that cause relevant diseases in domestic ruminants (Gortazar et al., 2015). In fact, transmissible diseases shared with wildlife are multi-host infections with an impact on animal health supported by numerous examples of parasitic, bacterial as well as viral infections (eg. toxoplasmosis, tuberculosis and bluetongue virus –BTV-, among others) (Jenkins 2015; Barasona 2015; Moť et al. 2018).

Several viral pathogens that are relevant abortifacient agents in cattle are shared with red deer. Particularly, Alphaherpesvirus (e.g. bovine herpesvirus type 1 -BoHV-1-) and pestivirus (e.g. bovine viral diarrhoea virus –BVDV- type 1 and type 2) infections are endemic cattle diseases in Spain that impact in reproductive and productive herd parameters. In addition, two vector borne viral infections, BTV and Schmallenberg

(SBV) also cause wildlife related diseases and have recently experienced changes in their epidemiology (Yon et al., 2018). Thus, red deer can act somehow as a virus reservoir in the natural environment (Thiry et al. 2006; Passler et al. 2009, 2016; López-Olvera et al. 2010; Linden et al. 2012).

Ruminant alphaherpesviruses infect various species of domestic and wild ruminants, among which BoHV-1 is the most relevant since it can cause different clinical diseases in cattle such as infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and infectious pustular vulvovaginitis (IPV), among others (Rola et al. 2017). However, there are two cervid herpesviruses 1 (CvHV-1) and 2 (CvHV-2) present in European wild ruminants (Deregt et al. 2005) and it has been reported the circulation of CvHV-1 strain in wild red deer in continental Europe (Thiry et al. 2007).

BoHV-1 infection is included on the B List of the World Organization for Animal Health (O.I.E., 2004), worldwide distributed in cattle and endemically present in Spanish cattle. In fact, González-García et al. (2009) reported 70.4% cattle herd seroprevalence in the south of Spain (Andalusia). Interestingly, isolation of cervid herpesviruses were never reported in Spain and low antibody seroprevalence rates against herpesvirus were found (Boadella et al. 2010). Additionally, there is no evidence of latent infections in red deer (Nettleton et al. 1988; Thiry et al. 2006).

Bovine viral diarrhea virus (BVDV), a pestivirus in the family Flaviviridae, was reported in both domestic and wild ruminant species from Spain (Paniagua et al. 2016; Rodríguez-Prieto et al. 2016). In fact, Rodríguez-Prieto et al. (2016) found high seroprevalence of BVDV in both cattle and red deer that share habitat. However, Paniagua et al. (2016) have recently stated that wild ruminants do not represent a risk for domestic ruminants. In fact, several studies suggest that the virus can be maintained in wild ruminants without contact with cattle (Frolich 1995; Passler et al. 2009, 2010; Ridpath 2012).

Finally, the wild ruminants could play a role in the epidemiology of two important vector borne viral infections. SBV was able to spread in an epizootic way among wild cervids in Belgium after the first outbreak of the disease in German, Belgian and Dutch cattle (Linden 2012). In Spain, SBV was detected in cattle (Balseiro et al 2013). Moreover, high seroprevalence rates were detected in roe deer (*Capreolus capreolus*) in Northern and Southern Spain (Fernández-Aguilar et al. 2014; Díaz et al. 2015) and García-Bocanegra et al. (2017) found antibodies anti-SBV in different red deer populations from Andalusia with an overall prevalence of 13.3 %.

BTB was detected in several European countries. Eight out of the 27 serotypes already known (1, 2, 4, 6, 8, 9, 10 y 16) have been circulating through different European countries, and there is a compulsory vaccination and movement restriction program in some of them (http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/bluetongue_en.htm). The susceptibility to infection or presence of antibodies in different species of wild ungulates has been demonstrated and red deer has been postulated as the main BTB reservoir (Ruiz-Fons et al. 2014). The presence of three serotypes of BTB, 1, 4 and 8, was officially declared in Spain, both in domestic and wild ungulates (García-Bocanegra et al. 2011).

Unfortunately, there are no surveillance studies on these four viral infections in the same red-deer population and most studies have focused on free ranging cervid

populations. Moreover, there is a need of determining the impact of these viral infections on the herd health of cervids populations (Ridpath et al. 2016). Thus, the aim of this work was to assess the prevalence and impact of BoHV-1 related alphaherpesvirus, BVDV, BTV and SBV on a closed red deer population in the absence of cattle for several decades and to evaluate the putative risk factors, such as age, sex and pregnancy status. Finally, the presence of lesions was investigated in placental and fetal samples collected from BoHV-1 seropositive pregnant hinds.

2. Material and Methods

2.1. Sampling area

The samplings were done in Quintos de Mora reserve, a hunting fenced area of 6,864 ha located in the province of Toledo (Central Spain) that extends on a plain at 800 meters above sea level (m.a.s.l.) and a surrounding mountainous area that reaches 1,200 m.a.s.l. The climate is Mediterranean, with cold winters (average temperature of the coldest month between 0° and 18° C) and hot (average temperature in the hottest month above 22°C) and dry summers (“Csa” following the climate classification of Köppen-Geiger) (AEMET-IMP 2011). The most representative mammals in the reserve are hunting species: red deer (*Cervus elaphus*), wild boar (*Sus scrofa*), fallow deer (*Dama dama*) and roe deer (*Capreolus capreolus*). Livestock had not been present in Quintos de Mora for at least five decades.

2.2. Experimental design

Seropositivity to BoHV-1 related herpesvirus and BVDV was studied in two samplings with an interval of 5 years between them, 2007 and 2012. The seroprevalence of BTV and SBV was determined in 2012 as well.

Changes in the management system of the Quintos de Mora reserve were implemented during a 5-year period from 2007 to 2012. The initial red deer population that comprised 2500 individuals (36.42 ind./ha), was reduced to 1700 individuals (24.77 ind./ha) (a 32% reduction) by means of controlled selective hunting. In addition, traditional food supplementation, done in fixed troughs during the dry season of the first year, was replaced by opening large fenced grazing areas (200 Ha), with sowings of barley and oat, to guarantee enough food supply in the summer time when hinds are in the lactation period (Peláez et al. 2017, 2018).

A total of 116 and 267 serum samples were collected during the first and second sampling, respectively. The number of animals sampled was representative, corresponding to 4,6% (116/2500) and 15,7% (267/1700) of the red deer population, respectively.

All the samples were collected during the hunting season: from the beginning of October to the end of February. The blood samples were opportunistically collected from selectively culled animals directly by heart puncture. Blood was collected in plastic tubes and sent to the laboratory at 4°C. In the laboratory, serum samples were collected after

centrifugation and stored at -80° C until analysis. Specific antibodies against all the viruses were detected by ELISA, as described below. Age was determined by morphological and metrical variables of canines (D'Errico and Vanhaeren 2002) and animals were classified in two age groups: juveniles (< 1 year) and adults (≥1 years). Moreover, sex and pregnancy data were annotated (Table 1). In pregnant animals, a sample of the placenta were collected from the hinds. Additionally, during the second sampling tissue samples from pregnant hinds (n=97) were collected (uterus and placentomes) together with their fetuses weighting more than 10 g (two month of gestation) (brain, liver, kidney, lung, heart and spleen). All samples collected were transferred to neutral-buffered 10% formalin solution. Histopathological analyses of the samples from BoHV-1 seropositive pregnant hinds (n=16) was performed (Table 2).

This study did not involve purposeful killing of animals. All samples came from dead wildlife legally hunted.

2.3. Serological assays

2.3.1. IBR ELISA

For the detection of specific antibodies against BoHV-1, the Hipra CIVTEST® BOVIS IBR gB test was employed. Optical Density (OD) values were expressed as Percentage of Inhibition (% IN) values by employing the following formula: $[(OD_{450m} NC - OD_{450} sample) / (OD_{450m} NC)] \times 100$. Sera with titers ≥ 35 were considered as positive.

2.3.2. BVDV ELISA

For the detection of specific antibodies against BVDV, the HIPRA CIVTEST BOVIS BVD/BD P80 test was employed. Optical Density (OD) values were expressed as Percentage of Inhibition (% IN) values by employing the following formula: $[(OD_{450m} NC - OD_{450} sample) / (OD_{450m} NC)] \times 100$. Sera with titers ≥ 50 were considered as positive.

2.3.3. BTV ELISA

For the detection of specific antibodies against BTV, the Ingenasa INgezim BTV DR test was employed. The assay is a double recognition ELISA where a sample is considered to be positive if its OD value at 450nm is higher than the cut off (0.15x mean positive control)

2.3.4. SBV ELISA

For the detection of specific antibodies against SBV, the ID vet Innovative Diagnostics Screen Schmallenberg Virus Indirect Multi-Species test was employed. IgG against the recombinant nucleoprotein of the emerging SBV was detected by using this ELISA and results are expressed as percentages of the reference signal yielded by the

positive control serum; serologic status is defined as negative (<60%), doubtful (60%-70%), or positive (>70%).

2.4. Histopathological analyses

Buffered formalin fixed tissue samples of one placental cotyledon (n=15) and several foetal viscera: brain (n=12), lung (n=15), liver (n=12), kidney(n=13), heart (n=14) and spleen (n=5) from a total of sixteen foetuses were processed for conventional histological analysis (Table 2). After dehydration, tissue samples were embedded in paraffin, cut at 4 µm and stained with haematoxylin and eosin (HE).

2.5. Data analysis

The seropositivity to BoHV-1, BVDV, BTV and SBV was estimated from the ratio of positive to total number of samples analysed. Seropositivity rates according to age, sex and pregnancy status were calculated and differences were determined by using Chi-square and Fisher exact test. Risk factors were also studied by estimating the odds ratio value (OR). *P* values < 0.05 were considered as statistically significant (Table 1).

3. Results

3.1. Seroprevalence and risk factor analysis

Seroprevalence of herpesvirus and BVDV infections according to age, sex and pregnancy status corresponding to both samplings are shown in Table 1. In the first sampling 11.6 % (10/116) red deers showed antibodies against BVDV. In contrast, all animals were seronegative during the second sampling (0/267) (*P* < 0.0001; OR=52.75, CI: 3.06-908.8,). Prevalence values did not show significant differences regarding age, sex and pregnancy status (*P* > 0.05).

Table 1: Seroprevalence of herpesvirus and BVDV infections according to age, sex and pregnancy status

Factor	Sampling	Category	BVD seroprevalence			IBR seroprevalence		
			N°. Positive/ N°. tested	(%)	OR (95% CI) <i>p</i> value	N°. Positive/ N°. tested	(%)	OR (95% CI) <i>p</i> value
<i>Age</i>								
	First sampling	< 1 year	1/10	10	2.5 (0.45-13.85)	0/10	0	0.75 (0.15-3.72)
		≥ 1 year	9/106	8,5	<i>p</i> > 0.05	25/106	23,5	<i>p</i> > 0.05
	Second sampling	< 1 year	0/56	0	-	5/56	8,9	0.34 (0.12-0.96)
		≥ 1 year	0/211	0	-	49/211	23.2	<i>p</i> > 0.05 (<i>p</i> =0.06)
<i>Sex</i>								
	First sampling	Male	5/70	7,1	1.36 (0.37-5.06)	10/70	14,3	2.9 (1.2-7.4)
		Female	5/46	10,9	<i>p</i> > 0.05	15/46	32,6	<i>p</i> < 0.05
	Second sampling	Male	0/99	0	-	8/99	8	2.4 (1.2-4.8)
		Female	0/168	0	-	42/168	25	<i>p</i> < 0.05
<i>Pregnancy status</i>								
	First sampling	Pregnant	2/11	18,1	5 (0.53-46.74)	8/11	72,7	12 (1.9-76.2)
		Non pregnant	2/29	6,9	<i>p</i> > 0.05	7/29	24,1	<i>p</i> < 0.05
	Second sampling	Pregnant	0/97	0	-	31/97	32	2.26 (1.03-4.96)
		Non pregnant	0/38	0	-	10/38	26,3	<i>p</i> > 0.05 (<i>p</i> =0.06)

Regarding BoHV-1, results showed that 21.6 % of tested animals (25/116) had antibodies against BoHV-1 in the first sampling and similar results (20.2 %; 54/267) were recorded 5 years later ($P > 0.05$). No significant differences ($P > 0.05$) were observed between age, gender and pregnancy status. However, in the first sampling pregnant hinds showed higher prevalence rates (18.1 %) compared to non-pregnant hinds (6.9 %) ($P < 0.01$; OR=8.38, CI: 1.73-40.55).

The seroprevalence found in the second sampling against the BTV was 2.2 % (6/267). Seropositive animals were adults: three females (2 pregnant and one non-pregnant hinds) and three males (7.5 year-average age). All samples were seronegative for SBV.

3.2. Histopathological results

The placenta and fetal tissues of BoHV-1 seropositive pregnant hinds (n=16) and their fetuses corresponding to the second sampling were analysed by histopathology. The fetuses were fresh and grossly visible multifocal necrosis in liver was not observed. Non-significant microscopic lesions were found in any of the studied tissues. Mild, multifocal and interstitial haemorrhages were observed in the lungs (n=5) and in one kidney. Two fetuses showed focal, mild, non-purulent myocarditis without necrosis of muscular fibres. Four fetuses showed congestion of the liver and hepatocyte vacuolation was observed in another one (Table 2). Neither necrotic foci with leucocyte infiltration nor inclusion bodies compatible with BoHV-1 infection were detected (Borel et al., 2014).

Table 2: Histopathological findings in fetal tissues of BoHV-1 seropositive hinds.

Hind number	Pregnancy trimester	Hind tissues		Foetal tissues					
		Uterus	Placentomes	Brain	Liver	Kidney	Lung	Heart	Spleen
1	First	-	-	-	-	-	-	-	NA
2	First	-	NA	-	-	-	-	NA	NA
3	First	-	-	-	-	-	Haemorrhages	-	NA
4	First	-	-	NA	-	-	Haemorrhages	-	NA
5	First	-	-	-	-	-	-	-	NA
6	ND	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	First	-	-	-	Hepatocyte vacuolation	-	Haemorrhages	-	NA
8	Second	-	-	-	-	-	-	-	NA
9	Second	-	-	-	Congestion	Haemorrhages	-	-	NA
10	Second	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Second	-	-	-	Congestion	-	Haemorrhages	-	NA
12	Second	-	-	-	-	-	-	Myocarditis	-
13	Second	-	-	-	Congestion	-	Haemorrhages	-	-
14	Second	-	-	-	Congestion	-	-	Myocarditis	-
15	Third	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Third	-	-	-	-	-	-	-	-

ND: Not determined; NA: Sample not available

4. Discussion

Our study is the first serosurvey of four relevant viral agents shared by both domestic and wild ruminants conducted in a Spanish red deer population. Moreover, the study was focused on a fenced closed population where management measures carried out during several years have been focused on Mediterranean forest preservation based on maintenance of an appropriate wild ungulates species census according to natural resources. This management policy has favored low or nule prevalence rates of relevant parasitic (San-Miguel et al. 2016) as well as zoonotic bacterial infections (San-Miguel et al. 2017) in the wild life and domestic ruminants interface. However, the health status regarding viral infections is not only dependant on management measures due to highly efficient aerogenous and vector borne transmission routes of some viral agents. Moreover, these four viral diseases are endemically present in Spanish cattle. BVDV and BoHV-1 prevalence rates have maintained high but for a few regional control programmes carried out in Northern Spain where prevalences have notably decreased (Eiras 2010). In contrast, the epidemiology of BTV and SBV infections have experienced noticeable changes due to vector (*Culicoides*) seasonality, compulsory vaccination programmes against BTV and the entrance and spread of SBV in Spain since 2012 (Falconi 2012; Ruiz-Fons et al. 2014; García-Bocanegra et al. 2017).

The results obtained herein evidenced BVDV, BoHV-1 related alphaherpesvirus and BTV circulation in the closed red deer population studied.

BVDV prevalence rates varied from 10% to nule and differed from other studies carried out in south-central Spain in hunting states. A higher seroprevalence rate (19.5%) was reported by Rodríguez- Prieto et al. (2016) that could be favored by the high animal densities, contact with cattle and access to shared watering, and supplementary feeding supplies. In contrast, Paniagua et al. (2016) reported 0.1% seroprevalence rate in red deer from southern Spain (Andalusia), despite virus circulation in neighboring domestic ruminants, suggesting an irrelevant role of wild ruminants in BVDV risk transmission for livestock. In the present study BVDV circulation only occurred during the first sampling

and five years later was absent. It has been reported that the infection can be maintained within a cervid population without contact with domestic cattle. In fact, Passler et al. (2016) showed that persistent infection of the fetus occurred in hinds in contact with white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) during the first third of gestation. BVDV risk of infection could occasionally occur in the natural environment and is likely to be associated with PI survival the density of the deer population (Rodríguez-Prieto et al. 2016). Ridpath et al. (2012), showed that the pathology associated with the infection of females of white-tailed deer is very similar to that in cattle, being the first third of gestation critical to be able to generate PIs after acute infection of the female. Moreover, in livestock high cattle densities increase the risk of BoHV1 outbreaks (Houe 1999).

Herein, the reduction in red deer census between samplings could explain the null seroprevalence found in 2012. Despite the impact of pestivirus infection in red deer remains to be clarified herein the foetus viability was not compromised since fresh foetuses did not showed either macroscopic nor specific microscopic lesions.

Contrary to the decrease of BVDV prevalence rates, BoHV-1 virus related prevalence rates hardly varied between 2007 and 2012. These results contrast with previous studies that reported limited BoHV-1 virus related transmission among red deer (Fabisiak et al. 2018). It has been established that BoHV-1 can infect red deer, but is unlikely to induce latency and a seroconversion (Thiry et al. 2006). However, it is not possible to discriminate between bovine and cervidae herpesvirus due to their close genetic and antigenic relationship (Deregt et al. 2005; Das Neves et al. 2009; Roic et al. 2018). Our results demonstrate that the red deer population studied was able to maintain an Alphaherpesvirus infection for years without contact with domestic livestock. Whether BoHV-1 or CvHV-1 and CvHV-2 are circulating in red deer populations has not been clarified yet. This issue should be a matter of further research since it could interfere with the eradication programs carried out in Europe by using diagnostic tests based on the detection of antibodies against BoHV-1. However, CvHV-1 is more likely to circulate in red deer (Squires et al. 2012). Recently Rola et al. (2017) detected higher antibody titers against CvHV-1 virus compared with BoHV-1 virus in red deers from Poland. Based on these results, it has been postulated that outbreaks of BHV-1 are hardly to occur in red deer populations.

We found higher seroprevalence rates in older animals. Our results agree with previous studies demonstrating that older animals are at a higher risk of BoHV-1 infection than younger animals (Raaperi 2014). On the other hand, we found a higher prevalence rate in pregnant animals that could be related to a reactivation of the virus as a consequence of immunosuppression (Nandi et al. 2009). The difference in prevalence between males and females could be related to their different behaviour. The males usually gather in small groups (Clutton-Brock et al. 1982; Carranza 2011) and move through bigger grazing areas, whilst females live in bigger groups in smaller grazing areas (Lazo et al. 1994). Thus, a closer contact in female groups may lead to an increased risk of infection. Another issue that deserves further research is whether Alphaherpesvirus cause reproductive failure in red deer. CvHV-1 and CvHV-2 can cause ocular syndrome and it has been suggested the putative involvement of CvHV-2 in abortion (Das Neves et al. 2009; Squires et al. 2012). Moreover, Das Neves et al. (2009, 2010) reported that an increase of CvHV2 seroprevalence was correlated with high animal density. In the present work typical lesions associated to BoHV-1 related infections were not evidenced in the different fetal tissues analysed (Borel et al. 2014).

Regarding vector borne viral infections SBV and BTV have experienced noticeable change in their epidemiology in Europe in the last few years (Larska et al. 2014; Ruiz-Fons et al. 2014). SBV initiated its spread in Spain in 2012 and nowadays is widely endemically present in wild ruminants from different regions of the country. García-Bocanegra et al. (2017) reported 13.3 % seroprevalence in red deer from Andalusia and 80% seroprevalence was found in roe deer in the Eastern Pyrenees (Northern Spain) (Fernández-Aguilar et al. 2014) and 53.3 % in Southern Spain (Díaz et al. 2015). In our study no seropositive animals were detected. These results can be easily explained by the fact that the present study was carried out before the first cases of SBV infection were recorded in domestic ruminants (Balseiro 2013). Our results agree with a surveillance study of SBV carried out in a few Spanish artiodactyle species where seropositive animals were detected from 2012 hunting season onwards (García-Bocanegra et al. 2017). Accordingly, the present situation of SBV infection in the sampled area could be different nowadays (Larska 2018).

Finally, our results show that BTV can be maintained in a wild population of red deer without any contact with domestic cattle. It is well known that BTV spread in livestock between 2014 and 2006 increased BTV seroprevalences in wild ruminants in Spain. However, despite massive vaccination that lead to BTV serotype 4 eradication in cattle, seropositive wild ruminants were still reported (Ruiz-Fons et al. 2014). It is interesting to highlight that the region where Quintos de Mora is located close to a National Park where BTV-serotype 4 had been previously circulating (Falconi et al., 2012). Indeed, nowadays three serotypes (1, 4 and 8) circulate in wild ruminants without reports on livestock in these areas (Ruiz-Fons et al. 2014). Thus, the sylvatic transmission cycle of the virus is of key relevance in Europe, where eradication and vaccination campaigns against the virus are limited to domestic ruminants.

To conclude with, our results have evidenced the relevance of red deer as a sentinel of virus circulation with no impact at least of BoHV-1 herpesvirus related infections on pregnancy viability. Low animal densities and good health status might explain the reduction of BVDV circulation. However, the maintenance of seropositivity against BoHV-1 related herpesvirus would be related with the putative infection by a predominant cervid herpesvirus and immunosuppression during pregnancy. On the contrary, BTV circulation in domestic ruminants might have favored the infection in wildlife since the epizootic situation of BTV infection has experienced similar changes in livestock and wildlife. BTV maintenance suggested by Lorca-Oró et al. (2014) and SBV presence in this closed fenced red deer population could be a matter of research in case of future outbreaks as they may occur in absence of livestock.

5. Acknowledgments

This study was financed by the SALUVET research group's own resources. Authors thank Consejería de Agricultura, Medio Ambiente y Desarrollo Rural de Castilla la Mancha, for the institutional authorization to collect the samples. Authors also thank Carlos Rodríguez-Vigal, Angel Moreno Gómez, and staff of Quintos de Mora for their collaboration in the samplings.

6. Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

CAPÍTULO V

Discusión

Hasta la fecha son escasos los estudios realizados sobre otras enfermedades relevantes en la producción, distintas a las enfermedades de declaración obligatoria (p. ej. la tuberculosis y la lengua azul), que repercuten en la reproducción, que son compartidas por los rumiantes domésticos y silvestres y que en algunos casos son zoonóticas. Por otra parte, se desconoce la situación sanitaria de las poblaciones de ciervo sometidas a una gestión cinegética y medioambiental encaminada a la preservación del hábitat mediante el control de la densidad poblacional, como medida más relevante. Por ello, la presente tesis doctoral ha estudiado por primera vez los efectos de una gestión sostenible realizada en una reserva de caza cerrada sobre la prevalencia de las infecciones causadas por los patógenos transmisibles y con impacto en la reproducción más relevantes en los rumiantes domésticos y que son compartidos con el ciervo: i) de etiología parasitaria (infecciones por *N. caninum* y *T. gondii*) (Objetivo 1), ii) de etiología bacteriana (infecciones por *Brucella* spp., *Leptospira* spp. y *Coxiella burnetii*) (Objetivo 2) y iii) de etiología vírica (BVDV, BoHV-1, BTV y SBV) (Objetivo 3). Además, la presente tesis doctoral se enmarca dentro de las directrices de “Una Única Sanidad”, ya que se ha considerado la fauna silvestre, el medio ambiente y el estudio de agentes zoonóticos como *T. gondii*, *Brucella* spp., *Leptospira* spp. y *C. burnetii*.

Los resultados se han obtenido en un contexto idóneo por varios motivos: i) en España la actividad cinegética es un sector económico clave, destacando la caza mayor donde sus principales exponentes son el jabalí y el ciervo; ii) la sobreabundancia de estas especies cinegéticas, unida a la ausencia de medidas de vigilancia epidemiológica (activa y pasiva) de las enfermedades transmisibles compartidas por el ganado doméstico, silvestre e incluso los humanos (enfermedades zoonóticas), están planteando importantes problemas sanitarios; iii) la gestión pública y privada de las reservas de caza debería contribuir al mantenimiento de una buena sanidad de nuestras poblaciones de ungulados silvestres para que puedan coexistir de forma sostenible con el ganado doméstico presente en los mismos hábitats.

En el caso de las infecciones de etiología protozoaria, el estudio (Objetivo 1) se centró en las infecciones por *T. gondii* y *N. caninum*, cuya prevalencia fue estudiada en poblaciones de corzo (*Capreolus capreolus*) y rebeco (*Rupicapra rupicapra*) de tres reservas de caza de la Cordillera Cantábrica (Riaño, Mapodre y Ancares) y de ciervo de una reserva cerrada ubicada en los Montes de Toledo (Reserva “Los Quintos de Mora”). En el caso del ciervo, se realizaron dos muestreos con un intervalo de cinco años entre ambos, destacando una alta densidad poblacional (37 reses/km²) en 2007 y una densidad admisible para bosques perennifolios (25 reses/km²) en 2012. Los valores de seroprevalencia fueron bajos en todos los casos, independientemente de las especies y zonas geográficas estudiadas y comparativamente más bajos que en otros países (Gaffuri et al. 2006; Bartova et al. 2007; Gozdzik et al. 2010; De Craeye et al. 2011; Dubey and Schares 2011; Malmsten et al. 2011) y que en otros estudios realizados previamente en España en el corzo (Gauss et al. 2006; Panadero et al. 2010), el rebeco (Gauss et al. 2006) y el ciervo rojo (Gauss et al. 2006; Almería et al. 2007). Es importante destacar que es difícil comparar los resultados obtenidos en los diferentes estudios, ya que influyen variables como el hábitat, el diseño experimental y las técnicas serológicas empleadas. Por otra parte, los resultados obtenidos en los rumiantes silvestres contrastan con los mayores valores de seroprevalencia de la infección por *T. gondii* y *N. caninum* descritos en los pequeños rumiantes y el ganado bovino de estas zonas, respectivamente (Eiras et al. 2011; Ortega-Mora et al. 2006; Pereira-Bueno et al. 2004). En el caso de la infección

por *Toxoplasma* las tasas de seroprevalencia fueron del 2% en el corzo y 4% en el rebeco. Por el contrario, el 13% de los ciervos analizados en 2007 fueron seropositivos descendiendo significativamente al 2% en 2012. En el caso de *N. caninum* solo encontramos prevalencias del 1% en el ciervo en ambos muestreos. Los resultados, por tanto, ponen de manifiesto la existencia de un ciclo silvático de *T. gondii*, posiblemente asociado a una escasa presencia de félidos silvestres, y que el consumo de estos animales supone un riesgo potencial para los humanos. En el caso de *N. caninum*, el ciclo silvático no parece ser relevante, al contrario del ciclo doméstico en el que los rumiantes domésticos juegan un papel primordial. *Neospora caninum* es la principal causa de abortos en bovino (Dubey 2003; Trees y Williams, 2005; Almería y López-Gatius 2013) y parece ser una causa cada vez más frecuente de aborto en el ganado ovino y caprino (Moreno et al. 2012; González-Warleta et al. 2014). La baja densidad de animales explicaría las bajas prevalencias detectadas en las poblaciones de corzo y rebeco de la Cordillera Cantábrica, así como en el segundo muestreo realizado en la reserva Los Quintos de Mora tras una gestión cinegética basada en la reducción del censo de animales, entre otras medidas.

En el segundo objetivo de la tesis doctoral se estudió la prevalencia de las infecciones de origen bacteriano y zoonóticas causadas por *Brucella* spp., *C. burnetii*, y *Leptospira* spp. en una población de ciervo de la reserva nacional de caza “Los Quintos de Mora”. Al igual que en el estudio anterior se compararon los resultados obtenidos en el año 2007 y año 2012 y se estudiaron posibles diferencias en relación a la edad, el sexo y la gestación. La información disponible hasta el momento pone en duda el papel que pueda jugar la fauna silvestre en la interrelación de los ciclos domésticos y silváticos de estos tres agentes bacterianos (Godfroid 2002; Arricau-Bouvery and Rodolakis 2005; Kirchgessner et al. 2013). De hecho, los resultados obtenidos indican que el ciervo, posiblemente, no sea un hospedador relevante de las especies lisas de *Brucella* y de *C. burnetii* en esta área, ya que no se encontraron anticuerpos frente a *Brucella* spp. y *C. burnetii* en ninguna de las muestras analizadas. En el caso de *Brucella* spp., nuestros resultados coinciden con estudios previos realizados en ciervos y otros rumiantes silvestres en diferentes regiones de España (Boadella et al. 2010; Muñoz et al. 2010; Serrano et al. 2011). Por el contrario, destaca la descripción de casos esporádicos de *Brucella* spp. en ciervos de la república Checa (Hubálek et al. 1993) y los Alpes italianos (Gaffuri et al. 2006) que se asociaron, principalmente, al posible contacto con ganado doméstico infectado (Hars et al. 2003), situación totalmente diferente a la de nuestro estudio. Con relación a España, los estudios previos de fiebre Q en fauna silvestre mostraron una seroprevalencia en el ciervo del 9,5% y 0% en las zonas norte y sur de España, respectivamente (Ruiz-Fons et al. 2008) y del 3,8% en ciervos en libertad cerca de nuestro área de estudio (González-Barrio et al. 2015). Estas diferencias podrían explicarse por las condiciones del hábitat y de un mayor o menor contacto con los rumiantes domésticos.

Sin embargo, los resultados más relevantes de este estudio correspondieron a los valores de seroprevalencia de *Leptospira* spp., ya que se observó un incremento de seroprevalencia entre los años 2007 y 2012 y una variación en los serovares encontrados. La prevalencia encontrada en el primer muestreo fue del 9,4%, para los serovares Canicola y Panama, mientras que cinco años después la seroprevalencia se incrementó hasta 38,5% y, únicamente, frente al serovar Pomona. La seroprevalencia encontrada inicialmente frente a los serovares Canicola y Panama podría explicarse por la presencia

de especies que actúan como reservorios de estas bacterias, como carnívoros y roedores (Moinet et al. 2010; Arijia 2010). Por otra parte, resulta sorprendente el incremento de la seroprevalencia frente al serovar Pomona que se detectó tras reducir la densidad poblacional del ciervo, y que es también superior a las descritas para otras poblaciones de ciervo de España (Arenas et al. 1991; Espí et al. 2010), lo cual podría asociarse a variaciones ecológicas y medioambientales. En esta ocasión, la presencia de especies epidemiológicamente relevantes, como el jabalí o los roedores (Arent et al. 2017) podrían explicar los resultados obtenidos. De hecho, la sobreabundancia de jabalíes se ha descrito en toda Europa y, si bien, se desconoce su censo en esta reserva los números de animales de esta especie abatidos indican un posible incremento de estas poblaciones entre ambos muestreos (35 en 2007 y 211 en 2012). Por tanto, el jabalí podría intervenir de forma decisiva en la transmisión de *Leptospira* al ciervo, por lo que debería contemplarse una reducción en el censo de esta especie en los planes de manejo integrales de las reservas cinegéticas.

La prevalencia se incrementó significativamente a partir de los dos años de edad de las reses, en consonancia con los resultados obtenidos en otros estudios en animales silvestres (Vale-Gonçalves et al. 2015), ya que la posibilidad de contacto con *Leptospira* spp. aumenta a lo largo de la vida del animal. Finalmente, no se detectaron diferencias en relación al sexo y la gestación. De hecho, no se detectó DNA de *Leptospira* en los tejidos fetales y placentarios analizados, posiblemente porque se trate de infecciones antiguas que se controlaron en un corto periodo de tiempo.

Estos resultados indicarían que el ciervo es un hospedador accidental del serovar Pomona (Ayanegui-Alcerreca et al. 2007). Sin embargo, son necesarios más estudios que clarifiquen el papel de *Leptospira* spp. como agente causal de abortos en el ciervo.

Finalmente, en el objetivo 3 de la presente tesis doctoral se ha realizado el primer estudio de seroprevalencia de los cuatro agentes de etiología vírica que cursan con fallo reproductivo en el ganado doméstico y que son compartidos por el ganado doméstico y los ungulados silvestres, BVDV, alfaherpesvirus relacionados con BoHV-1, SBV y BTV. Este estudio se ha realizado en la misma población de ciervos de la reserva cinegética “Los Quintos de Mora”, que en los estudios anteriores, en los años 2007 y 2012 en el caso del virus BVD y alfaherpesvirus relacionados con BoHV-1, y en el año 2012 en el caso de SBV y BTV. Nuestros resultados han demostrado que el ciervo es una especie centinela adecuada para monitorizar la circulación de estos virus previamente mencionados. En particular, detectamos animales seropositivos frente al virus BVD, alfaherpesvirus relacionados con BoHV-1 y BTV.

Las tasas de seroprevalencia frente a la infección por el BVDV descendieron drásticamente desde el 10% en 2007 hasta el 0% en 2012. Probablemente, el descenso en la seroprevalencia podría deberse a la reducción del censo de la población de ciervos entre ambos muestreos y al buen estado sanitario de esta población respecto a otros agentes transmisibles, como por ejemplo los de etiología protozoaria y bacteriana estudiados en los objetivos 1 y 2 (San Miguel et al. 2016; San Miguel et al. 2017). Estudios previos realizados en España han sugerido que el ciervo no participaría de forma relevante en la transmisión de este virus al ganado doméstico. De hecho, Paniagua et al. (2016) describieron una tasa de seroprevalencia únicamente del 0,1% en los ciervos de Andalucía, a pesar de que en este caso se sospechó de la circulación del virus BVD en poblaciones cercanas de rumiantes domésticos. En estudios donde se han descrito tasas superiores de

seroprevalencia (19% en reservas de caza del centro y sur del país) se piensa que estos valores podrían deberse a densidades elevadas de las poblaciones de ciervos estudiadas y al posible contacto con el ganado doméstico en zonas de suplementación de alimento o suministro de agua (Rodríguez- Prieto et al. 2016).

Las seroprevalencias observadas frente a la infección por herpesvirus relacionados con el virus BoHV-1 apenas variaron entre ambos muestreos demostrando que la población de ciervos estudiada fue capaz de mantener la infección sin contacto previo con el ganado doméstico. Sin embargo, se ha descrito que la transmisión de estos virus en el ciervo es limitada y se piensa que probablemente el virus no establezca latencia, ni induzca seroconversión en esta especie (Fabisiak et al. 2018; Thiry et al. 2006). Por otra parte, se piensa que el alfaherpesvirus que circula con mayor frecuencia en los ciervos es el herpesvirus de ciervo CvHV-1 (Squires et al. 2012), con similitudes antigénicas con el virus Bo-HV1. Por otra parte, en este estudio no se detectaron lesiones compatibles con la infección por BoHV-1 en los tejidos fetales analizados por lo que la infección no comprometió la viabilidad fetal.

Con relación a las infecciones víricas vectoriales, la epidemiología de las infecciones por SBV y BTV tanto en rumiantes domésticos como silvestres ha experimentado cambios muy relevantes en Europa en los últimos años (Larska et al. 2014; Ruiz-Fons et al. 2014). En este estudio no se detectaron animales seropositivos frente al SBV. Estos resultados, posiblemente, se deben a que este estudio se realizó con anterioridad a la detección de los primeros casos de esta infección vírica en los rumiantes domésticos (Balseiro 2013). En 2012 se describió el primer caso de Schmallenberg y a partir de entonces se ha diseminado entre el ganado ovino y bovino, siendo en la actualidad una enfermedad endémica en nuestro país. De hecho, a partir de entonces se han descrito tasas de seroprevalencia elevadas en el ciervo y corzo (Díaz et al. 2015; García-Bocanegra et al. 2017). Por tanto, la situación actual de la infección por SBV se desconoce en la reserva “Los Quintos de Mora” y podría haber variado sustancialmente en la actualidad (Larska 2018).

Al contrario que los virus BVD y BoHV-1, la circulación del BTV en rumiantes domésticos podría haber facilitado las infecciones en la fauna silvestre, ya que la situación epidemiológica de esta infección ha experimentado cambios similares en el ganado doméstico y los rumiantes silvestres. En este estudio, a pesar del reducido número de animales seropositivos encontrado, los resultados han demostrado que el virus puede circular en la población de ciervos en ausencia de ganado doméstico. Hay que destacar que la reserva “Los Quintos de Mora” está situada cerca del Parque Nacional de Cabañeros, donde previamente se describió la circulación de serotipo 4 (Falconi et al. 2012). Además, en la actualidad, los tres serotipos descritos en España (1, 4 y 8) en ganado doméstico están circulando en las poblaciones de rumiantes silvestres (Ruiz-Fons et al. 2014). Por tanto, el ciclo silvático del BTV es clave en Europa y debe tenerse en cuenta ya que las actuales campañas de vacunación y erradicación solo están incluyendo a los rumiantes domésticos.

Para concluir, las medidas de manejo encaminadas a preservar los recursos naturales y la sostenibilidad de las poblaciones de ciervos y del bosque mediterráneo implementadas en la reserva cinegética donde se han realizado los estudios de la presente tesis doctoral (p. ej. reducción del censo de ciervos y gestión de pastos naturales) han permitido una reducción de las tasas de seroprevalencia de enfermedades transmisibles

compartidas entre la fauna silvestre y los rumiantes domésticos, como las infecciones por *T. gondii* y el BVDV. Las altas concentraciones de animales en el espacio y el tiempo asociados a la escasez de puntos de agua y la suplementación alimenticia podrían tener efectos significativos sobre la prevalencia de estas infecciones. Por ello, la disponibilidad de pastos naturales y la implantación de pastos artificiales de calidad son prácticas que se recomiendan para una gestión sostenible de las reservas de caza al disminuir el riesgo de estrés por competencia. A estas prácticas debería sumarse el control de otras especies cinegéticas, como el jabalí, que pueden actuar como reservorios de enfermedades transmisibles relevantes como la leptospirosis y la tuberculosis. Sin embargo, la circulación del SBV y de otros serotipos del BTV no se descarta en este tipo de reservas cinegéticas en un futuro dada la naturaleza vectorial de estas infecciones y que son endémicas en nuestro país.

CAPÍTULO VI

Conclusiones

PRIMERA: Los valores de seroprevalencia de la infección por *T. gondii* detectados fueron bajos independientemente de las especies (corzo, rebeco y ciervo), zonas geográficas estudiadas (reservas de Riaño, Mampodre, Los Ancares y Los Quintos de Mora) y de si se trataba de reservas abiertas o cerradas, posiblemente debido a la baja densidad de animales en las reservas estudiadas y la escasa presencia de félidos silvestres. Aun así, se pone de manifiesto la existencia de un ciclo silvático de *T. gondii* y un riesgo potencial para los humanos asociado al consumo de carne de ciervo.

SEGUNDA: En el caso de *N. caninum*, la baja prevalencia detectada en ambos muestreos (1%) en la finca Los Quintos de Mora demuestran que el ciclo silvático no es relevante, al contrario que el ciclo doméstico, en el que los rumiantes domésticos juegan un papel primordial.

TERCERA: La ausencia de anticuerpos específicos frente a *Brucella spp.* y *C. burnetii* en las muestras analizadas indican que el ciervo, posiblemente, no sea un hospedador relevante en esta reserva cerrada y sin contacto con ganado doméstico.

CUARTA: Se observó un incremento de los valores de seroprevalencia de *Leptospira spp.* entre los años 2007 y 2012 y una variación en los serovares encontrados siendo en el primer muestreo del 9,4%, para los serovares Canicola y Panama, mientras que cinco años después la seroprevalencia se incrementó hasta 38,5% y, únicamente, frente al serovar Pomona. La presencia de especies que actúan como reservorios de *Leptospira spp.*, como el jabalí, diversos carnívoros y los roedores, podrían explicar estos resultados.

QUINTA: Se ha realizado el primer estudio de seroprevalencia de los cuatro agentes de etiología vírica que cursan con fallo reproductivo en el ganado doméstico y que son compartidos con los ungulados silvestres, BVDV, alfa herpesvirus relacionados con BoHV-1, Schmallemberg y el virus de la lengua azul, cuyos resultados de prevalencia han demostrado que, en condiciones de aislamiento, el ciervo puede mantener las infecciones por BVDV, alfa herpesvirus relacionados con BoHV-1 y BTV. Se necesitan futuros estudios para determinar la importancia del ciervo en el mantenimiento de la infección por SBV. Por tanto, los ciclos silváticos de las infecciones por BVDV, alfa herpesvirus relacionados con BoHV-1 y BTV han de ser tenidos en cuenta en la planificación de las campañas de erradicación de estas infecciones en el ganado doméstico.

SEXTA: Las medidas de manejo encaminadas a preservar los recursos naturales y la sostenibilidad de las poblaciones de ciervos y del bosque mediterráneo implementadas en la reserva cinegética donde se han realizado los estudios de la presente Tesis Doctoral; en concreto, la reducción de la densidad poblacional del ciervo y la implantación de pastos artificiales de calidad, han permitido una reducción de las tasas de seroprevalencia de enfermedades transmisibles compartidas entre la fauna silvestre y los rumiantes domésticos, como las infecciones por *T. gondii* y BVDV. Por tanto, se recomiendan estas prácticas para una gestión integral y sostenible de las reservas cinegéticas al disminuir el riesgo de estrés por competencia, a las cuales debería sumarse el control de otras especies cinegéticas, como el jabalí, que pueden actuar como reservorios de enfermedades transmisibles relevantes como la leptospirosis.

CAPÍTULO VII

Bibliografía

- Acevedo P, Delibes-Mateos M, Escudero MA, Vicente J, Marco J, Gortázar C. 2005. Environmental constraints in the colonization sequence of roe deer (*Capreolus Linnaeus*, 1758) across the Iberian Mountains, Spain. *J Biogeogr* 32:1671-1680.
- Acevedo P, Vicente J, Höfle U, Cassinello J, Ruíz-Fons F, Gortázar C. 2007. Estimation of European wild boar relative abundance and aggregation: A novel method in epidemiological risk assessment. *Epidemiol Infect* 135:519-527.
- Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J, Reyes-García AR, Alzaga V, Gortázar C. 2008. Estimating red deer abundance in a wide range of management situations in Mediterranean habitats. *Journal of Zoology* 276(1):37-47.
- Acevedo P, Farfán MA, Márquez AL, Delibes-Mateos M, Real R, Vargas JM. 2011. Past, present and future of wild ungulates in relation to changes in land use. *Landscape Ecology* 26:19-31.
- Ackermann M, Wyler R. 1984. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet Microbiol* 9:53-63.
- Ackermann M, Engels M. 2006. Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol* 113:293-302.
- Adler B, de la Peña Moctezuma A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140:287-296.
- AEMET-IMP. 2011. Iberian Climate Atlas. http://www.aemet.es/documentos/es/conocermas/recursos_en_linea/publicaciones_y_estudios/publicaciones/Atlas-climatologico/Atlas.pdf
- Agerholm JS. 2013. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals: a critical review. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55:13.
- Alexander KA, Pleydell E, Williams MC, Lane EP, Nyange JF, Michel AL. 2002. *Mycobacterium tuberculosis*: an emerging disease of free-ranging wildlife. *Emerging Infectious Diseases* 8(6):598-601.
- Almería S, Vidal D, Ferrer D, Pabón M, Fernández-de-Mera MI, Ruiz-Fons F, Alzaga V, Marco I, Calvete C, Lavín S, Gortázar C, López-Gatius F, Dubey JP. 2007. Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain. *Vet Parasitol* 143:21-28.
- Almería S, López-Gatius F. 2013. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. *Res Vet Sci* 95:303-309.
- Alonso-Andicoberry C, García-Peña FJ, Pereira-Bueno J, Costas E, Ortega-Mora LM. 2001. Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Prev Vet Med* 52:109.
- Álvarez G. 1988. Problemas asociados a la aplicación del transecto lineal para el censo de las poblaciones de cérvidos en un biotopo mediterráneo (Quintos de Mora Montes de Toledo). *Ecología* 2: 233-249.

- Álvarez M, González M, Álvarez F, López JM, Llamazares J. 1994. Prevalencia de las infecciones por el virus de la diarrea vírica bovina (BVD) en rebaños vacunos lecheros y su posible participación en problemas reproductivos. VII jornadas Internacionales de reproducción Animal. Murcia:199.
- Amatredjo A, Campbell RSF. 1975. Bovine leptospirosis. Veterinary Bulletin 43(12):875-891.
- Ames TR. 2005. In: Goyal SM; Ridpath, JF. Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control. Blackwell Publishing. Ames, Iowa:171-176. ISBN-10:0-8138-0478-7/2005.
- Andreoli E, Radaelli E, Bertolotti I, Bianchi A, Scanziani E, Tagliabue S, Mattiello S. 2014. *Leptospira* spp. infection in wild ruminants: A survey in Central Italian Alps. Vet Ital 50:285-291.
- Angelakis E, Raoult D. 2010. Q fever. Vet Microbiol 140:297-309.
- Anon. 2005. Bluetongue. In The Merck Veterinary Manual (ed. C. M. Kahn) 9th edn.
- Apollonio M, Anderson R, Putman R. 2010. European ungulates and their management in the 21st century. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Aranaz A, de Juan L, Montero N, Sanchez C, Galka M, Delso C, Alvarez J, Romero B, Bezos J, Vela AI, Briones V, Mateos A, Dominguez L. 2004. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. Journal of Clinical Microbiology 42(6):2602-2608.
- Arenas A, Perea A, Espejo J, Molera M, Tarradas C, García R, Anguiano A, Molina JM. 1991. Serological survey of some interesting bacterial agents in feral red deer (*Cervus elaphus*) from west 'Sierra Morena' Spain. Erkrankungen der Zootiere 33:241-244.
- Arenas A, Astorga R, Tarradas C, Maldonado A, Luque I, Perea A. 1997. Control of an outbreak of septicaemic pasteurellosis in wild red deer (*Cervus elaphus*). Erkrankungen der Zootiere 38:323-325.
- Arenas-Montes AJ, Arenas A, García-Bocanegra I, Mertens P, Batten C, Nomikou K. 2013. Serosurveillance of orbiviruses in wild cervids from Spain. Veterinary Record 172: 508-509.
- Arent Z, Frizzell C, Gilmore C, Mackie D, Ellis WA. 2013. Isolation of Leptospire from genital tract of sheep. Vet Rec 173:582.
- Arent ZJ, Gilmore C, San-Miguel Ayanz JM, Neyra LQ, García-Peña FJ. 2017. Molecular epidemiology of *Leptospira* serogroup Pomona infections among wild and domestic animals in Spain. Eco-health 14:48-57.
- Arias P, Orlich M, Prieto M, Cedillo Rosales S, Thiel HJ, Álvarez M, Becher P. 2003. Genetic Heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. Veterinary Microbiology 96:327-336.
- Arija C M. Turón-*Mustela putorius*. In: Salvador A, Cassinello J. 2010. eds. Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.

Armengol R, Pabón M, Santolaria P, Cabezón O, Adelantado C, Yániz J, López-Gatius F, Almería S. 2007. Low seroprevalence of *Neospora caninum* infection associated with the limousin breed in cow-calf herds in Andorra, Europe. J Parasitol 93:1029-1032.

Arnal MC, Gutiérrez-Expósito D, Martínez-Durán D, Regidor-Cerrillo J, Revilla M, Fernández de Luco D, Jiménez-Meléndez A, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G. 2016. Systemic Besnoitiosis in a Juvenile Roe Deer (*Capreolus capreolus*). Transbound Emerg Dis 64(5):e8-e14.

Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. 2005. Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? Vet Res 36:327-349.

Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, Meyer H, Neubauer H, Rodolakis A, Vergnaud G. 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. BMC Microbiol 6:38.

Astobiza I, Barral M, F. Ruiz-Fons F et al. 2011. Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. Veterinary Microbiology 147(1-2):190-194.

Atxaerandio R. 2001. Epidemiología y diagnóstico de la leptospirosis y la neosporosis bovina en explotaciones de bovino lechero de la Comunidad Autónoma del País Vasco. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.

Atxaerandio R, Aduriz G, Ziluaga I, Esteban JI, Maranda L, Mainar-Jaime RC. 2005. Serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection and its association with abortions in cattle in northern Spain. Vet Rec 156:376-380.

Ayanegui Alcérreca MA. 2006. Epidemiology and control of leptospirosis in farmed red deer in New Zealand. Tesis doctoral. Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Ayanegui-Alcerreca MA, Wilson PR, Mackintosh CG, Collins-Emerson JM, Heuer C, Midwinter AC, F Castillo-Alcala F. 2007. Leptospirosis in farmed deer in New Zealand: A review. N Z Vet J 55:102-108.

Azorit C, Analla M, Carrasco R, Calvo JA, Muñoz-Cobo J. 2002. Teeth eruption pattern in red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in southern Spain. Anales de Biología 24:107-114.

Bagust TJ, Clark L. 1972. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. J. Comp. Pathol. 82:375-383.

Balakrishnan G, Parimal R, Govindarajan R, Ramaswamy V, Manohar M. 2011. Seroepidemiological studies on Leptospirosis among bovines in an organized farm. IJAVMS 5(6):511-519.

Balseiro A, Royo LJ, GómezÁntona A, García-Marín JF. 2013. First Confirmation of Schmallenberg Virus in Cattle in Spain: Tissue Distribution and Pathology. Transboundary and Emerging Diseases:1-4.

Balseiro A, Gortazar C. 2015. Tuberculosis animal: Investigación y control en España. SERIDA, Gijón.

Bandini LA, Neto AFA, Pena HFJ, Cavalcante GT, Schares G, Nishi SM, Gennari SM. 2011. Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. Vet Parasitol 176:151-156.

Bang B. (1906). Infectious abortion in cattle. J Comp Pathol 19:191-202.

Barasona JA. 2015. Epidemiología y prevención en la interacción sanitaria entre ungulados domésticos y silvestres. Dissertation, IREC-University of Castilla—La Mancha, Ciudad Real, Spain.

Barr BC, Rowe JD, Sverlow KW, BonDurant RH, Ardans AA, Oliver MN, Conrad PA. 1994. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. J Vet Diag Invest 6:207-215.

Barratt J, Al Qassab S, Reichel MP, Ellis JT. 2008. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. Mol Cell Probes 22:228-233.

Bartels CJ, Arnaiz-Seco JI, Ruiz-Santa-Quitera A, Bjorkman C, Frossling J, Von BD, Conraths FJ, Schares G, Van MC, Wouda W, Ortega-Mora LM. 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, the Netherlands, Spain and Sweden. Vet Parasitol 137:17-27.

Bartova E, Sedlak K, Pavlik I, Literak I. 2007. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* anti-bodies in wild ruminants from the countryside or captivity in the Czech Republic. J Parasitol 93:1216-1218.

Barwick RS, Mohammed HO, McDonough PL, White ME. 1997. Risk factors associated with the likelihood of leptospiral seropositivity in horses in the state of New York. Am J Vet Res 58:1097-1103.

Bauermann FV, Flores EF, Ridpath JF. 2012. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhea virus 1 and 2 and HoBi virus: Possible impacts on diagnosis and control Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 24(2):253-261.

Beaman MH, Hun J. 1989. Pericarditis associated with tick-borne Q fever. Aust N Z J Med 19:254-256.

Bengis RG, Kock RA, Fischer J. 2002. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties 21(1):53-66.

Bengis RG, Leighton FA, Fischer JR, Artois M, Mömer T, Tate CM. 2004. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. Rev Sci Tech 23:497-511.

Benson WW, Brock DW, Mather J. 1963. Serologic analysis of a penitentiary group using raw milk from a q fever infected herd. Public Health Rep 78:707-710.

Berri M, Souriau A, Crosby M, Rodolakis A. 2002. Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. Vet Microbiol.85:55-60.

Berri M, Rousset E, Champion JL, Russo P, Rodolakis A. 2007. Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. Research in Veterinary Science 83:47-52.

Besi R, Syjetlana T, Tihomir F, Jelena P, Siniša O, Lorena J, Ivica B, Andreja J, Tomislav K. 2018. Preliminary serological and molecular investigation of selected viral pathogens in Croatian cervid species. *Acta Vet (Beogr)* 68:65-79.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. 2003. Peru-United States Leptospirosis Consortium. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3:757-771.

Bień J, Moskwa B, Bogdaszewski M, Cabaj W. 2011. Detection of specific antibodies anti-*Neospora caninum* in the fallow deer (*Dama dama*). *Res Vet Sci* 92(1):96-98.

Blanco JC. 1998. Mamíferos de España (2 Vols.). Editorial Planeta. Barcelona.

JM Blasco JM, C Gamazo C. 1994. Brucelosis animal. *Investigación y Ciencia* 218:56-62.

Blasco JM. 2010. Control and eradication strategies for *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Prilozi* 31:145-165.

Blasco JM, Molina-Flores B. 2011. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 27:95-104.

Boadella M, Carta T, Oleaga A, Pajares G, et al. 2010. Serosurvey for selected pathogens in Iberian roe deer. *BMC Vet Res* 6:51.

Bojar I, Szymanska J. 2010. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*—State of the art. *Ann Agric Environ Med* 17:209-214.

Bolin SR, Ridpath JF. 1989. Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified-live bovine viral diarrhea virus vaccines. *Am J Vet Res* 50 (6):817-821.

Bolin SR. 1990. The current understanding about the pathogenesis and clinical forms of BVD. *Vet Med* 85:1124-1132.

Bolin SR, Ridpath JF. 1992. Differences in virulence between two noncytopathic bovine viral diarrhea viruses in calves. *American Journal of Veterinary Research* 53(11):2157-2163.

Bolin SR, Ridpath JF. 1998. Prevalence of Bovine Viral Diarrhea Virus Genotypes and Antibody against those Viral Genotypes in Fetal Bovine Serum. *J Vet Diagnostic Investigation* 10(2):135-139.

Borel N, Frey CF, Gottstein B, Hilbe M, Pospischil A, Franzoso FD, Waldvogel A. 2014. Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. *Vet J Lond Engl* 200:218-229.

Bregoli M, Gioia C, Stefano N, Mariapia C, Claudio P. 2006. Serological survey of *Neospora caninum* in free-ranging wild ruminants. *Vet Arh* 76:S111-S115.

Brock KV, Redman DR, Vickers ML, Irvine NE. 1991. Quantitation of bovine viral diarrhea virus in embryo transfer flush fluids collected from a persistently infected heifer. *J Vet Diagn Invest* 3:99-100.

- Brock KV. 2003. The persistence of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals* 31(2):133-135.
- Buxton D, Maley SW, Pastoret PP, Brochier B, Innes EA. 1997. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Record* 141:308-309.
- Candela MG, Caballol A, Atance PM. 2017. Wide exposure to *Coxiella burnetii* in ruminant and feline species living in a natural environment: zoonoses in a human–livestock–wildlife interface. *Epidemiol Infect* 145:478-481.
- Carllson U. 1991. Border disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Veterinary Record* 128:145-147.
- Carman S. 1995. Typing of Ontario BVD Virus isolates from 1981 to 1994. Ontario Ministry of agriculture, Food, and Rural Affairs, Guelph.
- Carman S, van Dreumel T, Ridpath J, Hazlett M, Alves D, Dubovi E, Tremblay R, Bolin S, Godkin A, Anderson N. 1998. Severe Acute Bovine Viral Diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *J Vet Diagnostic Investigation* 10(1):27-35.
- Carnero M. 2015. La gestión cinegética de Riaño acabará con el ganado en un decenio, según los ecologistas. *Diario de León*, 29 de enero de 2015. http://www.diariodeleon.es/noticias/provincia/la-gestion-cinegetica-riano-acabara-ganado-decenio-ecologistas_952882.html.
- Carranza J. Ciervo-*Cervus elaphus*. In: Carrascal LM, Salvador A. 2004. eds. *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Carranza J. 2011. Ciervo-*Cervus elaphus*. En: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Salvador, A., Cassinello, J. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>.
- Carranza J, Salinas M, Andrés D, Pérez-González J. 2016. Iberian red deer: paraphyletic nature at mtDNA but nuclear markers support its genetic identity. *Ecology and evolution* 6(4):905-922.
- Carranza J. 2017. Ciervo – *Cervus elaphus* Linnaeus, 1758.
- Casaubon J, Vogt HR, Stalder H, Hug C, Ryser-Degiorgis MP. 2012. Bovine viral diarrhoea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. *BMC Veterinary Research* 8:204.
- Casaubon J, Chaignat V, Vogt HR, Michel AO, Thür B, Ryser-Degiorgi MP. 2013. Survey of bluetongue virus infection in free-ranging wild ruminants in Switzerland. *BMC Veterinary Research* 9:166.
- Castillo L, Fernández-Llario P, Carranza J, Bermejo F, Hermoso de Mendoza J. 2010. First seropositive cases of *Coxiella burnetii* in red deer populations in the southwest of Iberian Peninsula. *Journal of zoo and wildlife medicine* 41:468-473.

Castillo L, Fernández-Llario P, Mateos C, Carranza J, Benítez-Medina JM, García-Jiménez W, Bermejo-Martín F, Hermoso de Mendoza J. 2011. Management practices and their association with *Mycobacterium tuberculosis* complex prevalence in red deer populations in Southwestern Spain. Preventive Veterinary Medicine 98:58-63.

Castro HA, González SR, Prat MI. 2005. Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioquím Clín Latinoam 39(2):203-16.

Castrucci G, Frigeri F, Salvatori D, Ferrari M, Lo Dico M, Rotola, Sardoni Q, Petrini S, Cassai E. 2002. A Study on Latency in Calves by Five Vaccines Against Bovine Herpesvirus-1 Infection. Comp Immun Microbiol Infect Dis 25:205-215.

Cavalcante GT, Monteiro RM, Soares RM, Nishi SM, Alves Neto AF, Esmerini PdO, Sercundes MK, Martins J, Gennari SM. 2011. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed different tissues from naturally infected cattle. Vet Parasitol 179:220-223.

Caza y Safaris: Nacional. 2017. España es, tras Francia, el país europeo con más cazadores. 25-4-2017

Ceballos G, Ehrlich PR, Barnosky AD, García A, Pringle RM, Palmer TM. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. Science advances 1(5):e1400253.

Chase C, Braun LJ, Leslie-Steen P, Graham T, Miskimins D, Ridpath JF. 2008. Bovine viral diarrhea virus multiorgan infection in two white-tailed deer in southeastern South Dakota. J Wildl Dis 44(3):753-759.

Chiari M, Sozzi E, Zanoni M, Alborali LG, Lavazza A, Cordioli P. 2014. Serosurvey for Schmallenberg Virus in Alpine Wild Ungulates. Transboundary and Emerging Diseases. 61:1-3.

Clavero M, García-Berthou E. 2005. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. Trends in Ecology and Evolution 20(3):110-110.

Clutton-Brock TH, Guinness FE, Albon SD. 1982. Red deer: behavior and ecology of two sexes. University of Chicago press.

Coker R, Rushton J, Mounier-Jack S, Karimuribo E, Lutumba P, Kambarage D, Pfeiffer DU, Stärk K, Rweyemamu M. 2011. Towards a conceptual framework to support one-health research for policy on emerging zoonoses. The Lancet Infectious Diseases 11(4):326-331.

Collet MS, Larson R, Gold C, Strick D, Anderson DK, Purchio AF. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *pestivirus* bovine viral diarrhea virus. Virology 165:191-9.

Constantin EM, Shares G, Groossmann E, Sauter K, Roming T, Hartmann S. 2011. Studies on the role of red fox (*Vulpes vulpes*) as a potential definitive host of *Neospora caninum*. Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift 124(3-4):148-153.

Corapi WV, Elliott RD, French TW, Arthur DG, Bezek DM, Dubovi EJ. 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. Journal of the American Veterinary Medical Association 196(4):590-596.

- Corbel MJ 1997. Brucellosis: an overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses Jerusalem, Israel 3(2):213-221.
- Corbière F, Nussbaum S, Alzieu JP, Lemaire M, Meyer G, Foucras G, Schelcher F. 2012. Bluetongue Virus Serotype 1 in Wild Ruminants, France, 2008-10. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(4):1047-1051.
- Costa KS, Santos SL, Uzêda RS, Pinheiro AM, Almeida MAO, Araújo FR, McAllister MM, Gondim LFP. 2008. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 38:157-159.
- Cubero-Pablo MJ, Plaza M, Perez L, Gonzalez M, León-Vizcaino L. 2000. Seroepidemiology of chlamydial infections of wild ruminants in Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(1):35-47.
- Cunningham AA, Daszak P, Wood JLN. 2017. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372(1725): 20160167
- Czaplicki G, Houtain JY, Mullender C, Manteca C, Saegerman C. 2009. Bulk tank milk, reliable tool for diagnosing Q fever in dairy herds? *Epidemiol Santé Anim* 56:117-127.
- D'Anastasio R, Staniscia T, Milia ML, Manzoli L, Capasso L. 2011. Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. *Epidemiol Infect* 139:149-156.
- Darbyshire JH. 1960. A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. *Vet Rec* 72:331.
- Darpel K. E. et al. 2007 Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *Vet Rec* 161:253–261.
- Das Neves, C.G., Roger, M., Yoccoz, N.G., Rimstad, E., Tryland, M. 2009a. Evaluation of three commercial bovine ELISA kits for detection of antibodies against Alphaherpesviruses in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Acta Vet Scand* 51:9.
- Das Neves, C.G., Rimstad, E., Skjerve, E., Tryland, M., 2009b. Alphaherpesvirus infections in semidomesticated reindeer: a cross-sectional serological study. *Vet Microbiol* 139 (3-4):262-269.
- Das Neves CG, Roth S, Rimstad E, Thiry E, Tryland M. 2010. Cervid herpesvirus 2 infection in reindeer: A review. *Veterinary Microbiology* 143:70-80.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science* 287(5452):443-449.
- Davis DS. Brucellosis in wildlife. 1990. In: Neilsen K, Duncan JR, editors. *Animal brucellosis*. Boca Raton (FL): CRC Press: 322-334.
- Davis SW, Dubey JP. 1995. Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in cats. *J Parasitol* 81:882-886.
- Davison AJ. 2002. Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* 86:69-88.

Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. 2009. The order Herpesvirales. Arch Virol 154:171-177.

Davidson RK, Kutz SJ, Madslien K, Hoberg E, Handeland K. 2014. Gastrointestinal parasites in an isolated Norwegian population of wild red deer (*Cervus elaphus*). Acta Vet Scand 56:59.

De Almeida SC, Moreira EC, Gomes AG, Vale C. 1988. Infecção por *Leptospira interrogans*, numa fazenda de Minas Gerais, Brasil. Arq Bras Med Vet Zoot 40:137-144.

De Carlo E, Re GN, Letteriello R, Del Vecchio V, Giordanelli MP, Magnino S, Fabbi M, Bazzocchi C, Bandi C, Galiero G. 2004. Molecular characterisation of a field strain of bubaline herpesvirus isolated from buffaloes (*Bubalus bubalis*) after pharmacological reactivation. Vet Rec 154:171-174.

De Craeye S, Speybroeck N, Ajzenberg D, Darde ML, Collinet F, Tavernier P, Van Gucht S, Dorny P, Dierick K. 2011. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and Cervidae. Vet Parasitol 178:64-69.

De Meerschman F, Focant C, Boreux R, Leclipteux T, Losson B. 2000. Cattle neosporosis in Belgium: a case-control study in dairy and beef cattle. International Journal for Parasitology 30:887-890.

De Meerschman F, Speybroeck N, Berkvens D, Rettignera C, Focant C, Leclipteux T, Cassart D, Losson B. 2002. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. Theriogenology 58:933-945.

Delibes-Mateos M, Farfán MÁ, Olivero J, Márquez AL, Vargas JM. 2009. Long-term changes in game species over a long period of transformation in the Iberian Mediterranean landscape. Environmental Management 43(6):1256-1268.

De la Fuente C, Vicente J, Hofle U, Ruiz-Fons F, de Mera IGF, Van Den Bussche RA, Kocan KM, Gortázar C. 2004. Anaplasma infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain. Veterinary Microbiology 100(3-4):163-173.

Delsing CE, Kullberg BJ. 2008. Q fever in the Netherlands: a concise overview and implications of the largest ongoing outbreak”. Netherlands Journal of Medicine 66 (9):365-367.

Depner K., Hubschle OJB, Liess B. 1991. BVD-virus infections in goats--experimental studies on transmissibility of the virus and its effect on reproduction. Archives of Virology (3):253-256.

Deregt D, Jordan LT, van Drunen Littel-van den Hurk S, Masri SA, Tessaro SV, Gilbert SA. 2000. Antigenic and molecular characterization of a herpesvirus isolated from a North American elk. Am J Vet Res 61:1614-1618.

Deregt D, Gilbert SA, Campbell I, Burton KM, Reid HW, van Drunen Littel-van den Hurk S, Penniket C, Baxi MK. 2005. Phylogeny and antigenic relationships of three cervid herpesviruses. Virus Res 114:140-148.

Derrick EH. 1937. “Q” fever, new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigations. Med J Aust 2:281-299.

- D'Errico F, Vanhaeren M. 2002. Criteria for identifying red deer (*Cervus elaphus*) age and sex from their canines. Application to the study of upper palaeolithic and mesolithic ornaments. *J Archaeol Sci* 29:211-232.
- Dhama K, Chakraborty S, Kapoor S, Tiwari R, Kumar A, Deb R, Rajagunalan S, Singh R, Vora K, Natesan S. 2013. One world, one health-veterinary perspectives. *Adv Anim Vet Sci* 1(1):5-13.
- Díaz JM, Prieto A, López C, Díaz P, Pérez A, Panadero R, Pajares G, Díez-Baños P, Morrondo P, Fernández G. 2015. High spread of Schmallenberg virus among roe deer (*Capreolus capreolus*) in Spain. *Research in Veterinary Science* 102:231-233.
- Dinter, Z. 1963. Relationship between bovine virus diarrhea virus and hog cholera virus. *Zentbl Bakteriol Abt I* 188:475.
- Domingo I, Cuenca M, Gimeno F, Guerrero A. 2016. Incidencia de leptospirosis en España entre 2009-2012. *Rev Clín Española* 216:51-53.
- Donahoe E, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, Slapeta J. 2015. A review of neosporosis and pathological findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *Int J Parasitol Parasit Wildl* 4:216-238.
- Donis RO, Dubovi EJ. 1987. Molecular specificity of the antibody responses of cattle naturally and experimentally infected with cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus biotypes. *Am J Vet Res* 48:1549-1554.
- Donis RO. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Vet Clinics of North Am. Food An Practice* 11(3):393-423.
- Dressen DW. 1990. *Toxoplasma gondii* infections in wildlife. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 196:274-276.
- Dreyfus A, Wilson P, Benschop J, Collins-Emerson J, Verdugo C, Heuer C. 2018. Seroprevalence and herd-level risk factors for seroprevalence of *Leptospira* spp. in sheep, beef cattle and deer in New Zealand. *N Z Vet J* 66:302-311.
- Dubey JP. 1983. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet Parasitol* 13:199-211.
- Dubey JP. 1985. Serologic prevalence of toxoplasmosis in cattle, sheep, goats, pigs, bison, and elk in Montana. *J Am Vet Med Assoc* 186:969-970.
- Dubey JP. 1986. A review of toxoplasmosis in cattle. *Vet Parasitol* 22:177-202.
- Dubey JP, Beattie CP, 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL:1-220.
- Dubey JP, Kirkbride CA. 1989a. Enzootic toxoplasmosis in sheep in North-Central United-States. *J Parasitol* 75:673-676.
- Dubey JP, Kirkbride CA. 1989b. Economic and public health considerations of congenital toxoplasmosis in lambs. *J Am Vet Med Assoc* 195:1715-1716.
- Dubey JP, Carpenter JL. 1993. Neonatal toxoplasmosis in littermate cats. *J Am Vet Med Assoc* 203:1546-1549.

Dubey JP, Thulliez P, Powell EC. 1995. *Toxoplasma gondii* in Iowa sows: comparison of antibody titers to isolation of *T. gondii* by bioassays in mice and cats. J Parasitol 81:48-53.

Dubey JP. 1997. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. J Eukaryot Microbiol 44:592-602.

Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OCH, Blixt JA. 1997. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. J Parasitol 8:870-882.

Dubey JP, Rigoulet J, Lagourette P, George C, Longeart L, and LeNet JL. 1996. Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*). J Parasitol 82:338-339.

Dubey JP. 2001. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. J Parasitol 87:215-219.

Dubey JP, C.Barr BC, Barta JR, Bjerkås I, Björkman C, Blagburn BL, Bowman DD, Buxton D, Ellis JT, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howe DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattsson JG, McAllister MM, Modry D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton SJ, Williams DJL, Lindsay DS. 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. Int J Parasitol 32:929-946.

Dubey JP. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J Parasitol 41:1-16.

Dubey JP, Graham DH, de Young RW, Dahl E, Eberhard ML, Nace EK, Won K, Bishop H, Punkosdy G, Sreekumar C, Vianna MCB, Shen SK, Kwok OCH, Sumners JA, Demarais S, Humphreys JG, Lehmann T. 2004. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. J Parasitol 90:67-71.

Dubey JP, Hill DE, Jones JL, Hightower AW, Kirkland E, Roberts JM, Marcet PL, Lehmann T, Vianna MCB, Miska K, Sreekumar C, Kwok OCH, Shen SK, Gamble HR, 2005. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. J Parasitol 91:1082-1093.

Dubey JP. 2006. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. Vet Parasitol 140:69-75.

Dubey JP., Schares G, Ortega-Mora LM. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clinical Microbiology Reviews 20:323-367.

Dubey JP, Jones JL. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. Int J Parasitol 38:1257-1278.

Dubey JP, Schares G. 2011. Neosporosis in animals-The last five years. Vet Parasitol 180:90-108.

Duncan C, Ridpath J, Palmer MV, Driskell E, Spraker T. 2008a. Histopathologic and immunohistochemical findings in two white-tailed deer fawns persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest* 20:289-296.

Duncan C, Van Campen H, Soto S, LeVan IK, Baeten LA, Miller MW. 2008b. Persistent bovine viral diarrhea virus infection in wild cervids of Colorado. *J Vet Diagn Invest* 20(5):650-653.

Duong MC, Alenius S, Huong LTT, Björkman C. 2008. Prevalence of *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in Southern Vietnam. *Vet J* 175:390-394.

Edwards S, White H, Nixon P. 1990. A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the UK. *Vet Microbiol* 22:213-223.

Eiras Ferreiro, Carmen. Diarrea vírica bovina (BVD), rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y neosporosis bovina en Galicia: evaluación de la situación epidemiológica y diagnóstico en la leche de tanque. Dipòsit Legal: Eiras Ferreiro, Carmen: «Diarrea vírica bovina (BVD), rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y neosporosis bovina en Galicia: evaluación de la situación epidemiológica y diagnóstico en la leche de tanque». Santiago de Compostela: Universidade. Servizo de Publicacións e Intercambio Científico, 2010. ISBN 978-84-9887-354-2; 978-84-9887-354-2; <http://hdl.handle.net/10347/2783>.

Eiras C, Arnaiz I, Álvarez-García G, Ortega-Mora LM, Sanjuanl ML, Yus E, Dieguez FJ. 2011. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. *Prev Vet Med* 98:128-132.

Ek-Kommonen C, Pelkonen S, Nettleton PF. 1986. Isolation of a herpesvirus serologically related to bovine herpesvirus 1 from a reindeer (*Rangifer tarandus*). *Acta Vet Scand* 27:299-301.

Eklund CM, Parker RR, Lackman DB. 1947. A case of Q fever probably contracted by exposure to ticks in nature. *Public Health Rep* 62:1413-1416.

El Azhary MA, Roy RS, Frechette JL. 1979. Serological evidence of IBR and BVD infection in caribou (*Rangifer tarandus*). *Vet Rec* 105:336.

Ellis WA, Thiermann AB. 1986. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava from swine in Iowa. *Am J Vet Res* 47:1458-1460.

Ellis WA. 1994. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet Clin North Am: Food Anim Prac* 10:463-478.

Ellis JA, West KH, Cortese VS, Myers SL, Carman S, Martin KM, Haines DM. 1998. Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhea virus-type II. *Can J Vet Res.* 62(3):161-169.

Ellis WA. 2015. Animal leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 387:99-137.

Engels M, Steck F, Wyler R. 1981. Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 67:169-174.

Espi A, Prieto JM, Fernández M, Álvarez M. 2000. Serological prevalence to six leptospiral serovars in cattle in Asturias (Northern Spain). *Epidemiol Infect* 124:599-602.

Espí A, Prieto JM, García-Peña FJ. 2001. Prevalencia de *Leptospira interrogans* serovar Bratislava en Asturias. In: Proceedings of the VII Congreso Internacional de Medicina Bovina, Oviedo, Spain:236-238.

Espí A, Prieto JM, Alzaga V. 2010. Leptospiral antibodies in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), fallow deer (*Dama dama*) and European wild boar (*Sus scrofa*) in Asturias, Northern Spain. Vet J 183:226-227.

Estrada, A. 1995. Catálogo Geográfico de las garrapatas en la Península Ibérica. Ed. Mallinckrodt Veterinary.

European Food Safety Authority (EFSA). 2007. Review of the community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2005. EFSA J 600:1-32.

European Food Safety Authority (EFSA); "Schmallenberg" virus: Analysis of the epidemiological data and Impact assessment. EFSA Journal. 2012; 10(6):2768. doi:10.2903/j.efsa.2012.2768. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.

European Food Safety Authority (EFSA) (2013). - ‘Schmallenberg’ virus: analysis of the epidemiological data (May 2013). EFSA Supporting Publications 2013. EN-3429. Available at: www.efsa.europa.eu/de/supporting/doc/429e.pdf.

European Commision. Bovine and swine diseases situation 2016. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/la_annual-situation_2016.pdf

European Commission. Diseases and control measures: Bluetongue. 2018. European Commission website, 2018 (Home page address: <http://ec.europa.eu/food/animals-diseases/control-measures/bluetongue>).

Evaluación de los Ecosistemas del Milenio de España (EME). 2011. La Evaluación de los Ecosistemas del Milenio de España. Síntesis de resultados. Fundación Biodiversidad. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, Madrid, Spain. [online]URL: <http://www.fundacionbiodiversidad.es/images/stories/recursos/proyectos/biodiversidad/2008/fgua/lecomilenio.pdf>

Fabisiak M, Sałamaszyńska A, Stadejek T. 2018. Detection of seroconversion to bovine herpesvirus 1 related alphaherpesvirus and bovine viral diarrhoea virus in Polish free-living deer. Pol J Vet Sci 21:437-440.

Falconi C, López-Olvera JR, Gortázar C. 2011. BTV infection in wild ruminants, with emphasis on red deer: A review. Veterinary Microbiology 151:209-219.

Falconi C, López-Olvera JR, Boadella M, Camarena J, Rosell R, Alcaide V, Vicente J, Sánchez-Vizcaíno JM, Pujols J, Gortázar C. 2012. Evidence for BTV-4 circulation in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) in Cabañeros National Park, Spain. Veterinary Microbiology 159:40-46.

Fernández-Aguilar X, Pujols J, Velarde R, Rosell R, López-Olvera JR, Marco I, Pumarola M, Segalés J, Lavín S, Cabezón O. 2014. Schmallenberg Virus Circulation in High Mountain Ecosystem, Spain Emerging Infectious 20(6):1062-1064.

Fernández-García A, Alvarez-García G, Risco-Castillo V, Aguado-Martínez A, Marugán-Hernández V, Ortega-Mora LM. 2009. Pattern of recognition of *Besnoitia besnoiti* tachyzoite and bradyzoite antigens by naturally infected cattle. *Vet Parasitol* 164:104-110.

Fernández Olalla M, Muñoz Igualada J, Martínez Jauregui M, Rodríguez Vigal C, San Miguel Ayanz A. 2006. Selección de especies y efecto del ciervo (*Cervus elaphus* L.) sobre arbustados y matorrales de los Montes de Toledo, España central. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales* 15(3):329-338.

Fernández-Pacheco P, Fernández-Pinero J, Agüero M, Jiménez-Clavero MA. 2008. Bluetongue virus serotype 1 in wild mouflons in Spain *Veterinary Record* 162:659-660.

Ferrer C. 2016. El primate agricultor. Ed. Punto Rojo. Zaragoza.

Ferris DH, Hanson LE, Hoerlein AB, Beamer PD. 1960. Experimental infection of white-tailed deer with *Leptospira Pomona*. *Cornell Vet* 51:406-419.

Ferroglio E, Rossi L. 2001. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in wild ruminants from the Italian Alps. *Vet Rec* 148:754-755.

Ferroglio E, Pasino M, Romano A, Grande D, Pregel P, Trisciuglio A. 2007. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. *Vet Parasitol* 148:346-349.

Fishbein DB, Raoult D. 1992. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *Am J Trop Med Hyg* 47:35-40.

French, E.L. 1962. A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Aust Vet J* 38:216-221.

Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167:893-896.

Frölich K. 1995. Bovine Virus Diarrhea and Mucosal Disease in Free-ranging and Captive Deer (Cervidae) in Germany. *J Wildlife Diseases* 31(2):247-250.

Frölich K, Hamblin C, Parida S, Tuppurainen E, Schettler E. 2006. Serological Survey for Potential Disease Agents of Free-ranging Cervids in Six Selected National Parks from Germany. *Journal of Wildlife Diseases* 42(4):836-843.

Fuehrer HP, Blöschl I, Siehs C, Hassl A. 2010. Detection of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Encephalitozoon cuniculi* in the brains of common voles (*Microtus arvalis*) and water voles (*Arvicola terrestris*) by gene amplification techniques in western Austria (Vorarlberg). *Parasitol Res* 107:469-473.

Fundación Biodiversidad. 2013. Documento técnico que establece las principales acciones a desarrollar para determinar la situación de las poblaciones de competidores para el urogallo (*Tetrao urogallus cantabricus*). Fundación Biodiversidad, Madrid, España.

Gaffuri A, Giacometti M, Tranquillo VM, Magnino S, Cordioli P, Lanfranchi P. 2006. Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian Alps. *J Wildl Dis* 42:685-690.

Gamarra JA, Cabezón O, Pabón M, Arnal MC, Luco DF, Dubey JP, Gortázar C, Almería S. 2008. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in roe deer from Spain. *Vet Parasitol* 153:152-156.

García I, Napp S, Casal J, Perea A, Allepuz A, Alba A, Carbonero A, Arenas A. 2009. Bluetongue epidemiology in wild ruminants from Southern Spain. *European Journal of Wildlife Research* 55(2):173-178.

García-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Lorca-Oró C, Pujols J, González MA, Napp S, Gómez-Guillamón F, Zorrilla I, San Miguel E, Arenas A. 2011. Role of wild ruminants in the epidemiology of bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8 in Spain. *Veterinary Research* 42:88.

García-Bocanegra I, Cabezón O, Pabón M, Gómez-Guillamón F, Arenas A, Alcaide E, Salas-Vega R, Dubey JP, Almería S. 2012. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*). *Vet J* 191:257-260.

García-Bocanegra I, Cabezón O, Hernández E, Martínez-Cruz MS, Martínez-Moreno A, Martínez-Moreno J. 2013. *Toxoplasma gondii* in ruminant species (cattle, sheep, and goats) from southern Spain. *J Parasitol* 99:438-440.

García-Bocanegra I, Cano-Terriza D, Vidal G, Rosell R, Paniagua J, Jiménez-Ruiz S, Expósito C, Rivero-Juarez A, Arenas A, Pujols J. 2017. Monitoring of Schmallenberg virus in Spanish wild artiodactyls, 2006-2015. *PLoS ONE* 12(8):e0182212.

García-Ispuerto I, López-Helguera I, Tutusaus J, Serrano B, Monleón E, Badiola J, López-Gatius F. 2013. *Coxiella burnetii* shedding during the peripartum period and subsequent fertility in dairy cattle. *Reprod Domest Anim* 48(3):441-446.

García-Ispuerto I, Tutusaus J, López-Gatius F. 2014. Does *Coxiella burnetii* affect reproduction in cattle? A clinical update. *Reprod Domest Anim* 49:529-535.

García Peña FJ, Herrero Herrero A, García Baz S, San Miguel Ayanz JM. 2011. Leptospirosis: situación actual, diagnóstico y control. XVI Congreso Internacional ANEMBE de medicina bovina. Avila, España:37-46.

García Pérez A, Benedicto L, Barral M, Juste RA. 2000. Infección por *Ehrlichia phagcytophila* en rumiantes: resultados recientes acerca de la epidemiología, clínica y diagnóstico de la enfermedad. V Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas 27-29. Madrid.

García-Pérez AL, Astobiza I, Barandika JF, Atxaerandio R, Hurtado A, Juste RA. 2009. Short communication: investigation of *Coxiella burnetii* occurrence in dairy sheep flocks by bulk-tank milk analysis and antibody level determination. *Journal of Dairy Science* 92(4):1581-1584.

García-Seco T, Pérez-Sancho M, Martínez-Nevado E, Álvarez J, Santiago-Moreno J, Goyache J, Domínguez L, García N. (2016). Detection of *Coxiella burnetii* infection in a saharawi dorcas gazelle (*Gazella Dorcas Neglecta*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine 47:939-941.

Gauss CBL, Dubey JP, Vidal D, Cabezón O, Ruiz-Fons F, Vicente J, Marco I, Lavín S, Gortázar C, Almería S. 2006. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (*Cervus elaphus*) and other wild ruminants from Spain. Vet Parasitol 136:193-200.

Gerdts V, Beyer J, Lomniczi B, Mettenleiter TC. 2000. Pseudorabies virus expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence. J Virol 74:817-827.

Gerritsen MJ, Koopmans MJ, Peterse D, Olyhoek T. 1994. Sheep as maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis. Am J Vet Res 55:1232-1237.

Giammarioli M, Petrini S, Rossi E, Casciari C, Bazzucchi M, Torresi C, De Mia GM. 2014. Identification of a new genetic subtype of Bovine Viral Diarrhea Virus Genotype 1 isolated from dairy cattle in Italy. US BVDV/ESVV Pestivirus Symposium Pestiviruses: Old Enemies, New Challenges; Kansas City, MO October, 2014.

Giovannini A, Canceflotti FM, Turilli C, Randi E. 1988. Serological investigations for some bacterial and viral pathogens in fallow deer (*Cervus dama*) and wild boar (*Sus scrofa*) of the San Rossore preserve, Tuscany, Italy. Journal of Wildlife Diseases 24:127-132.

Godfroid J. 2002. Brucellosis in wildlife. Rev Sci Tech Off Int Epiz 21:277-286.

Gómez-Pacheco JM, Maldonado-Borrego JL, Gasca-Arroyo A. 1997. Resultados de un estudio de prevalencia serológica de BVD e IBR sobre ganado vacuno extensivo en Andalucía. II Symposium anual y AVEDILA. Córdoba :89.

Gómez Sal A, Lorente I. 2004. The present status and ecological consequences of transhumance in Spain. Pages 233–248 in R. G. H. Bunce, M. Pérez-Soba, R. H. G. Jongman, A. Gómez Sal, F. Herzog, and I. Austad, editors. *Transhumance and biodiversity in European mountains*. Report from the EU-FP5 project Transhumount. IALE Publication Series No. 1, Alterra, Wageningen, The Netherlands.

Gondim LFP, McAllister MM, Anderson-Sprecher RC, Björkman C, Lock TF, Firkins LD, Gao L, Fischer WR. 2004. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. J Parasitol 90:1394-1400

Gondim LFP, Gao L, McAllister MM. 2002. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. J Parasitol 88:1159-1163.

Gondim LFP, McAllister MM, Mateus-Pinilla NE, Pitt WC, Mech LD, Nelson ME. 2004. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. J Parasitol 90:1361-1365.

Gondim LFP, McAllister MM, Gao L. 2005. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. Vet Parasitol 134:33-39.

Gondim LFP. 2006. *Neospora caninum* in wildlife. Trends in parasitology 22(6):247-252.

Gondim LSQ, Abe-Sandes K, Uzêda RS, Silva MSA, Santos SL, Mota RA, Vilela SMO, Gondim LFP. 2010. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. Vet Parasitol 168:121-124.

González LM; San Miguel A (Coord.). 2004. Manual de buenas prácticas de gestión en fincas de monte mediterráneo de la red Natura 2000. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.

González-Barrio D, Velasco AL, Boadella M, Beltrán-Beck B, Barasona JA, Santos JPV, Queirós J, García-Pérez AL, Barral M, Ruiz-Fons F. 2015. Host and environmental factors modulate the exposure of free-ranging and farmed red-deer (*Cervus elaphus*) to *Coxiella burnetii*. Appl Environ Microbiol 81:6223-6231.

González-Barrio D, Almería S, Caro MR, Salinas J, Ortiz JA, C. Gortázar C, Ruiz-Fons F. 2015. *Coxiella burnetii* Shedding by Farmed Red Deer (*Cervus elaphus*) Transboundary and Emerging Diseases. 62:572-574.

González-Barrio D, Rúa-Fons F. 2019. *Coxiella burnetii* in wild mammals: A systematic review. Transbound Emerg Dis 66(2):662-671.

Gonzalez-Garcia MA, Arenas-Casas A, Carbonero-Martinez A, Borge-Rodriguez C, Garcia-Bocanegra I, Maldonado JL, Gomez-Pacheco JM, Perea-Remujo JA. 2009. Seroprevalence and risk factors associated with bovine herpesvirus type 1 (BHV1) infection in non-vaccinated cattle herds in Andalusia (South of Spain). Spanish Journal of Agricultural Research 7(3):550-554.

González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Regidor-Cerrillo J, Benavides J, Álvarez-García G, Fuertes M, Ortega-Mora LM, Mezo M. 2014. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. Vet Res 45:88.

Gortazar C, Fernández de Luco D, Frölich K. 1998. Keratoconjunctivitis in a free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) population in Spain. Zeitschrift fur Jagdwissenschaft 44(4):257-261.

Gortázar C, Herrero J, Villafuerte R, Marco J. 2000. Historical examination of the status of large mammals in Aragon, Spain. Mammalia 64:411-422.

Gortázar C, Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J. 2006. Disease risks and overabundance of game species. European Journal of Wildlife Research, 52(2):81-87.

Gortázar C, Ferroglio E, Höfle U, Frölich K, Vicente J. 2007. Diseases shared between wildlife and livestock: A European perspective. Eur J Wildl Res 53:241-256.

Gortazar C, Torres MJ, Vicente J, Acevedo P, Reglero M, de la Fuente J, Negro JJ, Aznar-Martin J. 2008. Bovine Tuberculosis in Doñana Biosphere Reserve: The Role of Wild Ungulates as Disease Reservoirs in the Last Iberian Lynx Strongholds. PLoS ONE 3(7):e2776.

Gortazar C, Vicente J, Boadella M, Ballesteros C, Galindo RC, Garrido J, De La Fuente J. 2011. Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. Veterinary microbiology 151(1):170-178.

Gortázar C, Vicente J, de la Fuente J, Nugent G, Nol P. 2015. Tuberculosis in Pigs and Wild Boar. En: Tuberculosis, Leprosy and Mycobacterial Diseases of Man and Animals: The Many Hosts of Mycobacteria (eds. Mukundan, H.; Chambers, M. A.; Waters, W. R.; Larsen, M. H.). CABI, New York.

Gortazar C, Diez-Delgado I, Barasona JA, Vicente J, De La Fuente J, Boadella M. 2015. The wild side of disease control at the wildlife-livestock- human interface: a review. *Frontiers in Veterinary Science* 1:article 27.

Gozdzik K, Jakubek EB, Bjorkman C, Bien J, Moskwa B, Cabaj W. 2010. Seroprevalence of *Neospora caninum* in free living and farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Poland. *Pol J Vet Sci* 13:117-120.

Graham DA, Gallagher C, Carden RF, Lozano JM, Moriarty J, O'Neill R. 2017. A survey of free-ranging deer in Ireland for serological evidence of exposure to bovine viral diarrhoea virus, bovine herpes virus-1, bluetongue virus and Schmallenberg virus. *Irish Veterinary Journal* 70:1-11.

Guatteo R, Beaudeau F, Joly A, Seegers H. 2007. Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk-shedder cows using a real-time PCR applied to bulk tank milk. *Zoonoses Public Health* 54:191-194.

Guatteo R, Seegers H, Taurel AF, Joly A, Beaudeau F. 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review. *Vet Microbiol* 149:1-16.

Guillespie J, Baker JA, McEntee JA. 1960. A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Veterinarian* 50:73-79.

Gutián FJ. 2001. Estudios observacionales de las infecciones por BHV-1, BVDV y *Leptospira hardjo* en explotaciones lecheras de Galicia y norte de Portugal en Estudios observacionales de agentes infecciosos asociados a ineficacia reproductiva en explotaciones de ganado vacuno lechero. Tesis doctoral. Facultade de veterinaria de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela.

Gutián J, García-Peña FJ, Oliveira J, Sanjuán ML, Yus E. 2001. Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. *Vet Microbiol* 80:275-284.

Gutiérrez-Expósito D, Ortega-Mora LM, Marco I, Boadella M, Gortázar C, San Miguel-Ayán JM, García-Lunar P, Lavín S, Álvarez-García G. 2013. First serosurvey of *Besnoitia* spp. infection in wild European ruminants in Spain. *Vet Parasitol* 197:557-564.

Guy CS, Williams DJL, Kelly DF, McGarry JW, Guy F, Björkman C, Smith RF, Trees AJ. 2001. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet Rec* 149:443-449.

Habela MA, Peña J, Corchero E, Sevilla RG. 2000. Garrapatas y hemoparásitos transmitidos de interés veterinario en España. Facultad de Veterinaria de Cáceres UEX - Schering-Plough Animall Health.

Hage JJ, Vellema P, Schukken YH, Barkema HW, Rijsewijk FA, van Oirschot JT, Wentink GH. 1997. Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus 1 transmission. *Vet Microbiol* 57:41-54.

Halliday JE, Meredith AL, Knobel DL, Shaw DJ, de C Bronsvort BM, Cleaveland S. 2007. A framework for evaluating animals as sentinels for infectious disease surveillance. *Journal of the Royal Society interface* 4(16):973-984.

Hars J, Game Y, Le Tallec Y, Gauthier D. 2003. Surveillance de la brucellose du chamois (*Rupicapra rupicapra*) en Savoie: Historique et données récentes. *Bull Inf Pathol Anim Sauv* 26:168-169.

Hartley WJ, Marshall SC. 1957. Toxoplasmosis as a cause of ovine perinatal mortality. *N Z Vet J* 5:119-124.

Hathaway SC. 1981. Leptospirosis in New Zealand: an ecological view. *NZ Vet J* 29:109-112.

Heinzen RA, Hackstadt T, Samuel JE. 1999. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol* 7:149-154.

Herremans T, Hogema BM, Nabuurs M, Peeters M, Wegdam-Blans M, Schneeberger P, Nijhuis C, Notermans DW, Galama J, Horrevorts A, Loo IHM, Vlamincx B, Zaaijer HL, Koopmans MP, Berkhout H, Socolovschi C, Raoult D, Stenos J, Nicholson W, Bijlmer H. (2013). Comparison of the performance of IFA, CFA, and ELISA assays for the serodiagnosis of acute Q fever by quality assessment. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 75:16-21.

Herruzo AC, Martínez-Jauregui M. 2013. Trends in hunters, hunting grounds and big game harvest in Spain. *Forest Systems* 22(1):114-122.

Hirai K y To H. 1998. Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 60(7):781-790.

Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeier H, Eschbaumer M, Goller KV, Wernike K, Fischer M, Breithaupt A, Mettenleiter TC, Beer M. 2012. Novel Orthobunyavirus in Cattle, Europe. 2011. *Emerging Infectious Diseases* 18(3):469-472.

Hoffmann B, Schulz C, Beer M. 2013. First detection of Schmallerberg virus RNA in bovine semen, Germany. *Vet Microbiol* 167(3-4):289-295.

Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol* 64:89-107.

Houe H. Risk Assessment. In: Goyal SM; Ridpath, JF. 2005. *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control*. Blackwell Publishing. Ames, Iowa: 35-64. ISBN-10:0-8138-0478-7/2005.

Howerth EW, Stallknecht DE, Kirkland PD. 2001. Bluetongue, epizootic haemorrhagic disease, and other orbivirus-related diseases. In: Williams ES, Barker IK (Eds.) *Infectious Diseases of Wild Mammals*. Iowa State University Press Ames:77-97.

- Hubálek Z, Juricová Z, Svobodová S, Halouzka J. 1993. A serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic. *J Wildl Dis* 29:604-607.
- Hubalek Z, Scholz HC, Sedlacek I et al. 2007. Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 7:679-687.
- Hueli LE, Díaz-Saez V. 1987. Ixódidos (Acarina, Ixodidae) parásitos del ciervo (*Cervus elaphus* L.) en Sierra Morena (España). *Revista Ibérica de Parasitología* 47(3): 309-310.
- Hughes JM, Thomasson D, Craig PS, Georgin, S, Pickles A, Hide G. 2008. *Neospora caninum*: detection in wild rabbits and investigation of co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis. *Exp. Parasitol.* 120, 255–260.
- Hurtado A, García-Pérez AL, Aduriz G, Juste RA. 2003. Genetic diversity of ruminant pestiviruses from Spain *Virus Research* 92:67-73.
- Hurtado A, Aduriz G, Gómez N, Oporto B, Juste RA, Lavin S, Lopez-Olvera JR, Marco I. 2004. Molecular Identification of a New *pestivirus* Associated with Increased Mortality in the Pyrenean Chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 40(4):796-800.
- Inglis DM, Bowie JM, Allan MJ, Nettleton PF. 1983. Ocular disease in red deer calves associated with a herpesvirus infection. *Vet Rec* 113:182-183.
- Innes EA et al. 2001 Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol* 31:1523-1534
- IREC. 2017. Evaluación de protocolos de bioseguridad y de la gestión de ungulados en la transmisión de enfermedades compartidas (ONEGEST). <http://www.irec.es/difusion/noticias/nuevo-proyecto-onegest-protocolos-bioseguridad-ungulados/>.
- Iberian Climate Atlas. 2011. AEMET: www.aemet.es/documentos/es/conocermas/publicaciones/Atlas-climatologico/Atlas.pdf
- Jackova A, Novackova M, Pelletier C, Audeval C, Gueneau E, Haffar A, Petit E, Rehby L, Vilcek S. 2008. The extended genetic diversity of BVDV-1: Typing of BVDV isolates from France. *Vet Res Commun* 32:7-11.
- Thomson RCA. 2013. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *International Journal for Parasitology* 43(12–13):1079-1088
- Jenkins EJ, Simon A, Bachand N, Stephen C. 2015. Wildlife parasites in a One Health world. *Trends Parasitol* 31:174-180.
- Johnston L, Simmons G, McGavin M. 1962. A viral meningoencephalitis in calves. *Aust Vet J* 38:207-215.
- Johnson M, Smith H, Joseph P, Gilman R, et al. 2004. Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerg Infect Diseases* 10:1016-1022.
- Jones JL y Dubey JP. 2012. Foodborne toxoplasmosis. *Junco L.* 2018. Expansión 20-4-2018. *Clin Infect Dis* 55(6):845-851.

- Kautto AH, Alenius S, Mossing T, Becher P, Belák S, Larska M. 2012. Pestivirus and alphaherpesvirus infections in Swedish reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.). *Veterinary Microbiology* 156:64-71.
- Keuser, V., Gogev, S., Schynts, F., Thiry, E., 2002. Demonstration of generalized infection with caprine herpesvirus 1 diagnosed in an aborted caprine fetus by PCR. *Vet Res Commun* 26:221-226.
- Keuser V, Espejo-Serrano J, Schynts F, Georgin JP, Thiry e. 2004a. Isolation of caprine herpesvirus type 1 in Spain. *The Veterinary Record* 154:395-399.
- Keuser V, Schynts F, Detry B, Collard A, Robert B, Vanderplasschen A, Pastoret PP, Thiry E. 2004b. Improved Antigenic Methods for Differential Diagnosis of Bovine, Caprine, and Cervine Alphaherpesviruses Related to Bovine Herpesvirus 1. *Journal of Clinical Microbiology* 42(3):1228-1235.
- Khalili M, Sakhaee E, 2009. An update on a serologic survey of Q Fever in domestic animals in Iran. *Am J Trop Med Hyg* 80:1031-1032.
- Kim SG, Kim EH, Lafferty CJ, Dubovi E. 2005: *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerg Infect Dis* 11:619-621.
- King LJ, Anderson LR, Blackmore CG, Blackwell MJ, Lautner EA, Marcus LC, Pappaioanou M. 2008. Executive summary of the AVMA one health initiative task force report. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 233(2):259-261.
- Kirchgeßner MS, Dubovi EJ, Whipps CM. 2013. Disease risk surface for *Coxiella burnetii* seroprevalence in white-tailed deer. *Zoonoses Public Health* 60:457-460.
- Kirkland PD, Frost MJ, Finlaison DS, King KR, Ridpath JF, Gu X. 2007. Identification of a novel virus in pigs-Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res* 129:26-34.
- Klaassen CHW, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJHC, Hamans MAWM, Horrevorts AM. 2009. Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 15(4):613-614.
- Kock RA. 2005. What is this infamous wildlife/livestock disease interface? A review of current knowledge for the African continent, pp: 1-13. En: Osofsky, S.A. (Ed.) *Conservation and development interventions at the wildlife/livestock interface: implications for wildlife, livestock and human health*, 30. IUCN. Cambridge, UK.
- Köppel C, Knopf L, Thür B, Vogt HR, Meli ML, Lutz H, Stärk KDC. 2007. Bovine virus diarrhea and the vector-borne diseases Anaplasmosis and Bluetongue: a sero-surveillance in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) in selected areas of Switzerland. *Eur J Wildl Res* 53:226-230.
- Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel, F. 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification update. *Meteorologische Zeitschrift* 15:259-263.
- Krametter R, Nielsen SS, Loitsch A, Froetscher W, Benetka V, Moestl K, Baumgartner W. 2004. Pestivirus Exposure in Free-living and Captive Deer in Austria *Journal of Wildlife Diseases*, 40(4):791-795.

- Kruszewska D, Tylewska-Wierzbanowska S. 1997. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. Res Vet Sci 62:299-300.
- Kutish G, Mainprize T, Rock D. 1990. Characterization of the latency-related transcriptionally active region of the bovine herpesvirus 1 genome. J Virol 64:5730-5737.
- Lang GH. 1990. Coxiellosis (Q fever) in animals. In The Diseases, Volume I. Edited by Marrie TJ. Boca Raton: CRC Press:23-48.
- Lang-Ree J, Vatn T, Kommisrud E, Loken T. 1994. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. Veterinary Record 135:412-413.
- Larska M, Krzysiak MK, Kęsik-Maliszewska J, Jerzy Rola J. 2014. Cross-sectional study of Schmallenberg virus seroprevalence in wild ruminants in Poland at the end of the vector season of 2013. BMC Veterinary Research 10:307.
- Larska M. 2018. Schmallenberg virus: a cyclical problem. Vet Rec.183:688-689.
- Lazo A, Soriguer RC, Fandos P. 1994. Habitat use and ranging behaviour of a high density population of Spanish red deer in a fenced intensively managed area. Applied Animal Behaviour Science 40:55-65.
- Lee K, Guillespie J. 1957. Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue culture. Am J Vet Res 18:952-955.
- Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. 2006. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(30):11423-11428.
- León-Vizcaíno L, Molera M, Gasca A, Garrido F, Rodríguez MD, Hierro ML. 1985. Serological survey of prevalence of antibodies to brucellosis in wild ruminants in Jaen (Spain). Erkrankungen der Zootiere 27:455-461.
- León-Vizcaíno L, Hermoso de Mendoza M, Garrido F. 1987. Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 10:149-153.
- León-Vizcaíno L, Cubero-Pablo MJ, Astorga-Márquez R, Oliver-Hernández P, et al. 1994. Encuesta inmunológica en ciervos en Andalucía. XIX Jornadas Científicas de la S.E.O.C., Burgos (Spain). Consejería de Agricultura. Junta de Castilla- León 323-331.
- León-Vizcaíno L, Ruíz de Ybáñez MR, Cubero MJ, Ortiz JM, Espinosa J, Pérez L, Alonso F. 1999. Sarcoptic mange in Spanish ibex from Spain. Journal of Wildlife Diseases 35(4):647-659.
- Levett PN. 2001. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 14:296-326.
- Levine ND. 1977. Taxonomy of *Toxoplasma*. J Protozool 24(1):36-41.
- Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD. 2002. Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection with highly virulent bovine viral diarrhoea virus type 2 in calves. Am J Vet Res 63(11):1575-1584.
- Liess B, Orban S, Frey H, Trautwein G, Wiefel W, Blindow H. 1984. Studies on transplacental transmissibility of a Bovine Virus Diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B 31:669-681.

- Lillehaug A, Vikøren T, Larsen IL, kerstedt JA, Tharaldsen J, Handeland K. 2003. Antibodies to ruminant alpha-herpesviruses and pestiviruses in norwegian cervids Journal of Wildlife Diseases, 39(4):779-786.
- Linden A, Grégoire F, Nahayo A, Hanrez D, Mousset B, Massart L, De Leeuw I, Vandemeulebroucke E, Vandenbussche F, De Clercq K. 2010. Bluetongue Virus in Wild Deer, Belgium, 2005–2008. Emerging Infectious Diseases 16(5):833-836.
- Linden A, Desmecht D, Volpe R, Wirtgen M, Gregoire F, Pirson J, Paternostre J, Kleijnen D, Schirmer H, Martin Beer M, Garigliany MM. 2012. Epizootic Spread of Schmallenberg Virus among Wild Cervids, Belgium, Fall 2011. Emerging Infectious Diseases 18(12):2006-2008.
- Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Veterinary Parasitology 82:327-333.
- Little TWA. 1983. Q Fever: an enigma. British Veterinary Journal 139:277-83.
- López-Gatius F, López-Béjar M, Murugavel K, Pabón M, Ferrer D, Almería S. 2004. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. Journal of Veterinary Medicine Series B 51:348-352.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Garbaya JM, Almería S. 2005. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora* seropositive dairy cows. Journal of Veterinary Medicine Series B 52:88-92.
- López-Olvera JR, Falconi C, Fernández-Pacheco P, Fernández-Pinero J, Sánchez MA, Palma A, Herruzo I, Vicente J, Jiménez-Clavero MA, Arias M, Sánchez-Vizcaíno JM, Gortázar C. 2010. Experimental infection of European red deer (*Cervus elaphus*) with bluetongue virus serotypes 1 and 8. Vet Microbiol 145:148-152.
- Lorca-Oró C, López-Olvera JR, Ruiz-Fons F, Acevedo P, García-Bocanegra I, Oleaga Á, Gortázar C, Pujols J. 2014. Long-term dynamics of bluetongue virus in wild ruminants: relationship with outbreaks in livestock in Spain, 2006-2011. PloS One 9: e100027.
- Lukesova D, Literak I. 1998. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by Felidae in zoos in the Czech Republic. Vet Parasitol 74:1-7.
- Lyaku, J.R.S., Nettleton, P.F., Marsden, H., 1992. A Comparison of serological relationships among 5 ruminant alphaherpesviruses by ELISA. Arch. Virol. 124, 333–341.
- MacLachlan NJ, Mayo CE. 2013. Potential strategies for control of bluetongue, a globally emerging, Culicoides-transmitted viral disease of ruminant livestock and wildlife. Antiviral Research 99:79–90.
- Mainar-Jaime RC, Berzal-Herranz B, Arias P, Rojo-Vázquez FA. 2001. Epidemiological pattern and risk factors associated with bovine viral-diarrhoea virus (BVDV) infection in a nonvaccinated dairy cattle population from the Asturias region of Spain. Prev Vet Med 52(1):63-73.
- Malmsten J, Jakubek EB, Bjorkman C. 2011. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in moose (*Alces alces*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Sweden. Vet Parasitol 177:275-280.

Manzano-Baena P, Casas R. 2010. Past, present and future of Trashumancia in Spain: nomadism in a developed country. *Pastoralism* 1:72-90.

MAPAMA (ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente). 2015. Informe sobre resultados del Programa Nacional de Vigilancia en Fauna Silvestre 2015. MAPAMA. Madrid. http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informe_fauna_silvestre_2015_tcm7-453285.pdf.

MAPAMA. 2017a. Plan Nacional de Vigilancia Sanitaria en Fauna Silvestre Marzo 2017. http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pnvs_fauna_silvestre_tcm7-453284.pdf.

MAPAMA. 2017b. PATUBES Plan de Actuación sobre Tuberculosis en Especies Silvestres: http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/patubes2017_3_tcm7-452413.pdf.

Marco J, Herrero J, Escudero MA, Fernández-Arberas O, Ferreres J, García-Serrano A et al. 2011. Veinte años de seguimiento poblacional de ungulados silvestres de Aragón. *Pirineos* 166:135-153.

Marín J. 1997. IBR y BVD: seroprevalencia en animales con trastornos reproductivos. Análisis, evolución y situación actual en Extremadura. *Producción Animal* 119:2.

Maroto JV. 1998. Historia de la Agronomía. Una versión de la evolución histórica de las ciencias y técnicas agrarias. Mundi-Prensa. Madrid, España.

Marquez A, Djelouadji Z, Lattar V, Kodjo A. 2017. Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospirae. *Int Microbiol* 20:184-193.

Marrie TJ, Raoult D. 1997. Q fever: a review and issues for the next century. *Int J Antimicrob Agents* 8:145-161.

Martin WB, Castrucci G, Frigeri F, Ferrari M. 1990. A serological comparison of some animal herpesviruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Di.* 13:75-84.

Martínez Jauregui M, Arenas C, Herruzo Martínez AC. 2011. Understanding long-term hunting statistics: the case of Spain (1972-2007). *"Forest Systems"*(1):139-150.

Masala G, Porcu R, Daga C, Denti S, Canu G, Patta C, Tola S. 2007. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J Vet Diagn Invest* 19:96-98.

Maurin y Raoult. 1999. Q fever. *Clin Microbiol Rev* 12:518-553.

McCaughey C, Murray LJ, McKenna JP, Menzies FD, McCullough SJ, O'Neill HJ, Wyatt DE, Cardwell CR, Coyle PV. 2010. *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiol Infect* 138:21-27.

McDaniel CJ, Cardwell DM, Moeller Jr RB, Grayl GC. 2014. Humans and Cattle: A Review of Bovine Zoonoses. *Vector-Borne and zoonotic diseases* 14(1):1-19.

Metzler AE, Matile H, Gassmann U, Engels M, Wyler R. 1985. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol* 85:57-69.

- Meltzer E, Yechezkel S, Smolen G, Banai M, Bardenstein S, Schwartz E. 2010. Sexually Transmitted Brucellosis in Humans. *Clinical Infectious Diseases* 51(2):e12-e15.
- Meyer KF y Shaw EB. 1920. A comparison of the morphologic, cultural, and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*. *J Infect Dis* 27:173-184.
- Meyers G, Tautz N, Dubovi EJ, Thiel HJ. 1991. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* 180:602-16.
- Meyling A, Jensen AM. 1988. Transmission of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) by artificial insemination (AI) with semen from a persistently-infected bull *Veterinary Microbiology* 17(2):97-105.
- Meyling A, Houe H, Jensen AM. 1990. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev sci tech Off int Epiz* 9(1):75-93.
- Milazzo A, Hall R, Storm PA, Harris RJ, Winslow W, Marmion BP. 2001. Sexually transmitted Q fever. *Clin Infect Dis* 33:399-402.
- Millán J, Cabezón O, Pabón M, Dubey JP, Almería S. 2009. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in feral cats (*Felis silvestris catus*) in Majorca, Balearic Islands, Spain. *Vet Parasitol* 165:323-326.
- Miller JM, Whetstone CA, Van der Maaten MJ. 1991. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res* 52:458-461.
- Milner AR, Wilks CR, Calvert K. 1980. The prevalence of antibodies to members of *Leptospira interrogans* in cattle. *Aus Vet J* 56:327-330.
- Moerman A, Straver P, de Jong M, Quak J, Baanvinger T, van Oirschot J. 1993. A long term epidemiological study of bovine viral diarrhoea infections in a large herd of dairy cattle. *Veterinary Record* 132:622-626.
- Moinet M, Fournier-Chambrillon C, André-Fontaine G, Aulagnier S, Mesplède A, Blanchard B, Descarsin V, Dumas P, Dumas Y, Coïc C, Couzi L, Fournier P. 2010. Leptospirosis in free-ranging endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores (Mustelidae, Viverridae) from southwestern France. *J Wildl Dis* 46: 1141-1151.
- Mollema L, Rijsewijk FAM, Nodelijk G, de Jong MCM. 2005. Quantification of the transmission of bovine herpesvirus 1 among red deer (*Cervus elaphus*) under experimental conditions *Veterinary Microbiology* 111:25-34.
- Moreno B, Collantes-Fernández E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM. 2012. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet Parasitol* 187:312-318.
- Moț D, Nichita I, Tîrziu E, Moț T. 2018. Bluetongue in Europe and Romania in the Last Years. *Animal Sciences and Biotechnologies* 51(1):203-213.
- Mouchantat S, Wernike K, Lutz W, Hoffmann B, Ulrich RG, Börner K, Wittstatt U, Beer M. 2015. A broad spectrum screening of Schmallenberg virus antibodies in wildlife animals in Germany. *Veterinary Research* 46:99.

Munhoz AD, Pereira MJS, Flausino W, Lopes CWG. 2009. *Neospora caninum* seropositivity in cattle breeds in the South Fluminense Paraíba Valley, state of Rio de Janeiro. *Pesq Vet Bras* 29:29-32.

Muñoz PM, Boadella M, Arnal M, de Miguel MJ, Revilla M, Martínez D, J Vicente J, Acevedo P, Oleaga Á, Ruiz-Fons F, Marín CM, Prieto JM, de la Fuente J, Barral M, Barberán M, Fernández de Luco D, Blasco JM, Gortázar C. 2010. Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. *BMC Infect Dis* 10:46.

Murray JO, Trainer DO. 1970. Bluetongue virus in North American elk. *Journal of Wildlife Diseases* 6:144-148.

Musso D, Broult J, Parola P, Raoult D, Fournier PE. 2014. Absence of antibodies to *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp. and *Coxiella burnetii* in Tahiti, French Polynesia. *BMC Infect Dis* 14:255.

Muyilkens B, Thiry J, Kirten, P, Schynts F, Thiry E. 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res* 38:181-209.

Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS. 2009. Bovine herpes virus infections in cattle *Animal Health Research Reviews* 10(1):85-98.

Narita M, Inui S, Namba K, Shimizu Y. 1976. Trigeminal ganglionitis and encephalitis in calves intranasally inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J Comp Pathol* 86:93-100.

Narita M, Inui S, Namba K, Shimizu Y. 1981. Recrudescence of infectious bovine rhinotracheitis virus and associated neural changes in calves treated with dexamethasone. *Am J Vet Res* 42:1192-1197.

Nascimento Porto WJ, Regidor-Cerrillo J, de Cássia P, Peixoto Kim PC, Benavides J, dos Santos Silva AC, Horcajo P, da Fonseca Oliveira AA, Ferre I, Aparecido Mota R, Luis Miguel Ortega-Mora LM. 2016. Experimental caprine neosporosis: the influence of gestational stage on the outcome of infection. *Vet Res* 47:29

National Institute of Allergy and Infectious Diseases. List of NIAID Emerging and Re-emerging Diseases. 2011. Available at www.niaid.nih.gov/topics/emerging/pages/introduction.aspx/.

Neill JD, Ridpath JF, Fischer N, Grundhoff A, Postel A, Becher P. 2014. Complete genome sequence of pronghorn virus, a *pestivirus*. *Genome Announc* 2(3):e00575-14.

Nelson DD, Dark MJ, Bradway DS, Ridpath JF, Call N, Haruna J, Rurangirwa FR, Evermann JF. 2008. Evidence for persistent bovine viral diarrhea virus infection in a captive mountain goat (*Oreamnos americanus*). *J Vet Diagn Invest* 20:752-759.

Nettleton PF, Thiry E, Reid HW, Pastoret PP. 1988. Herpesvirus infections in cervidae. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 7:977-988.

Nettelton PF. 1990. *Pestivirus* infection in ruminants other than cattle. *Rev Sci Tech* 9:131-150.

Nettleton PF, Entrican G. Ruminant pestiviruses. 1995. *Br vet J* 151:615.

Nielsen SS, Roensholt L, Bitsch V. 2000. Bovine Virus Diarrhea Virus in Free-Living Deer from Denmark. *J Wildlife Diseases* 36(3):584-587.

Nixon, P., Edwards, S., White, H., 1988. Serological comparisons of antigenically related herpesviruses in cattle, red deer and goats. *Vet Res Commun* 12:355-362.

Nylin B, Madsen KG, Ronsholt L. 1998. Reintroduction of Bovine Herpes Virus type 1 into Danish cattle herds during the period 1991.1995: a review of the investigations in the infected herds. *Acta Vet Scand* 39:401-413.

OIE. 2015. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. www.oie.int.

Olafson P, MacCallum AD, Fox A. 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet* 36:205.

Olde Riekerink RGM, Dominici A, Barkema HW, de Smit AJ. 2005. Seroprevalence of *pestivirus* in four species of alpine wild ungulates in the High Valley of Susa, Italy *Veterinary Microbiology* 108:297-303.

Oleaga A, Casais R, González-Quirós P, Prieto M, Gortazar C. 2008. Sarcoptic mange in red deer from Spain: Improved surveillance or disease emergence? *Veterinary Parasitology* 154(1-2):103-113.

Olmeda AS, García Romero C, Corchero J, Valcárcel F. 2000a. Dinámica estacional de los ixódidos parásitos de ciervos (*Cervus elaphus*) en tres provincias de Castilla La Mancha. V Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas, Madrid.

Olmeda AS, Caride E, Valcárcel F. 2000b. Parasitosis hemáticas del ciervo. *Ovis* 69:49-60.

Olmeda AS, Caride E, Mateos A, García Romero C, Corchero J, Valcárcel F. 2001. Garrapatas y enfermedades transmitidas en ciervo. *Ovis* 75:37-48.

Ortega-Mora LM, Fernández-García A, Gómez-Bautista M. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitol* 51:1-14.

Ortega-Mora LM, Aguado Martínez A, Álvarez García G. 2006. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and goats in Spain. Comunicación oral. Congreso: Toxofood, Palermo, Italia.

Pabón M, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Bech-Sàbat G, Nogareda C, Almería S. 2007. Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3-year study. *Veterinary Parasitology* 147:40-46.

Panadero R, Panceira A, López C, Vázquez L, Paz A, Díaz P, Dacal V, Cienfuegos S, Fernández G, Lago N, et al. 2010. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (northwest Spain). *Res Vet Sci* 88:111-115.

Paniagua J, García-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Berriatua E, Espunyes J, Carbonero A, Rosell R, Marco I, Cabezón O. 2016. Absence of circulation of Pestivirus between wild and domestic ruminants in southern Spain. *Veterinary Record* 178(9).

Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis* 12:351-357.

Parra A, García A, Inglis NF, Tato A, Alonso JM, Hermoso de Mendoza M; Hermoso de Mendoza J, Larrasa J. 2006. An epidemiological evaluation of *Mycobacterium bovis* infections in wild game animals of the Spanish Mediterranean ecosystem. *Research in Veterinary Science* 80(2):140-146.

Passler T, Walz PH, Ditchkoff SS, Walz HL, Givens MD, Brock KV. 2008. Evaluation of hunter-harvested white-tailed deer for evidence of bovine viral diarrhea virus infection in Alabama. *J Vet Diagn Invest* 20:79-82.

Passler T, Walz PH, Ditchkoff SS, K. V. Brock KV, Deyoung RW, Foley AM, Givens MD. 2009. Cohabitation of pregnant white-tailed deer and cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus results in persistently infected fawns. *Veterinary Microbiology* 134:362-367.

Passler T, Ditchkoff SS, Givens MD, Brock KV, Deyoung RW, Walz PH. 2010. Transmission of bovine viral diarrhea virus among white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet Res* 41:20.

Passler T, Riddell KP, Edmondson MA, Galik PK Zhang Y, Walz PH. 2014. Evaluation of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) transmission from a persistently infected goat to pregnant goats and calves. *US BVDV/ESVV pestivirus Symposium. Pestiviruses: Old Enemies, New Challenges*; Kansas City, MO October, 2014.

Passler T, Ditchkoff SS, Walz PH. 2016. Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *Frontiers in Microbiology* 7: article 945.

Pastoret PP, Thiry E, Brochier B, Derboven G. 1982. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency. *Ann Rech Vét* 13:221-235.

Pato FJ; Vázquez L; Dacal V; López CM; Panadero R; Lago N; Morrondo P, Fernández G. 2010. Prevalencia de brucelosis, tuberculosis y paratuberculosis en corzos cazados en Galicia (NO de España) en 2007-2008. *Galemys* 22:295-308.

Paton DJ, Goodey R, Brockman S, Wood L. 1989. Evaluation of the quality and virological status of semen from bulls acutely infected with BVDV. *Vet Rec* 124(3):63-64.

Paton DJ, Ibata G, Edwards S, Wensvoort G. 1991. An ELISA detecting antibody to conserved *pestivirus* epitopes. *Journal of Virological Methods* 31:315-24.

Paton DJ, Simpson V, Done SH. 1992. Infection of pigs and cattle with bovine viral diarrhoea virus on a farm in England. *The Veterinary Record* 131(9):185-188.

Peach W, Fowler J, Hay J. 1989. Incidence of *Toxoplasma* infection in a population of European starlings *Sturnus vulgaris* from Central England. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 83:173-177.

Pedersen K, Anderson TD, Maison RM, Wiscomb GW, Pipas MJ, Sinnott DR, Baroch JA, Gidlewski T. 2018. Leptospira antibodies detected in wildlife in the USA and the US Virgin Islands. *J Wild Dis* 54:450-459.

Peláez M; San Miguel A; Rodríguez-Vigal C; Perea R. 2017. Climate, female traits and population features as drivers of breeding timing in Mediterranean red deer populations. Integrative Zoology. DOI: 10.1111/1749-4877.12252.

Peláez, M.; Perea, R.; Díaz, M.; San Miguel, A.; Vigal, C.R.; Coté, S. 2018. The use of cast antlers to assess antler size variation in red deer populations: Effect of mast seeding, climate and population density in Mediterranean environments. Journal of Zoology 306(1): 8-15.

Pellerin C, Van Den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. Virology 203:260-268.

Perea R; Girardello M; San Miguel A. 2014. Big game or big loss? High deer densities are threatening woody plant diversity and vegetation dynamics. Biodiversity and Conservation 23:1303-1318.

Perea R; Perea R; Díaz-Ambrona CG; San Miguel A. 2015. The reintroduction of a flagship ungulate *Capra pyrenaica*: Assessing sustainability by surveying woody vegetation. Biological Conservation 181:9-17.

Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Perez-Perez V, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega- Mora LM. 2004. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. Vet Parasitol 121: 33-43.

Pérez-Arellano JL, Carranza Rodríguez C, Gutierrez C, Bolaños Rivero M. 2018. Epidemiología de la fiebre Q en España (2018). Rev Esp Quimioterapia 31(5):386-405.

Pérez-Carral C; Sanz V; San Miguel A. 1993. Bases para la determinación de la carga de ciervos admisible en el monte mediterráneo. Necesidades y disponibilidad de alimento pp: 441-448. En: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (Ed.) "Actas XXXIII Reunión Científica". Ciudad Real.

Pérez-Zaballos FJ, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Navarro-Lozano V, García-Villada L, Costas E. 2005. Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: An argument in favor of its clonal population structure. J Parasitol 91:507-510.

Peters M, Lutkefels E, Heckeroth AR, Schares G. 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. International Journal of Parasitology 31:1144-1148.

Pimentel D, Zuniga R, Morrison D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. Ecological economics 52(3):273-288.

Pineda F. 2001. Intensification, rural abandonment and nature conservation in Spain. Pages 23–38 in R. G. H. Bunce, M. Pérez-Solba, B. S. Elbersen, M. J. Prados, E. Andersen, M. Bell, and P. J. A. M. Smeets, editors. *Examples of European agri-environment schemes and livestock systems and their influence on Spanish cultural landscapes*. Alterra Rapport 309, Wageningen, The Netherlands.

Plant JW, Littlejohns IR, Gardiner AC, Vantsis J, Huck R. 1973. Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. *Veterinary Record* 92:455.

Plataforma por la Ganadería Extensiva y el Pastoralismo. 2017. Definición y caracterización de la extensividad en las explotaciones ganaderas en España. MAPAMA. http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/definicionycharacterizaciondelaextensividadenlasexplotacionesganaderasdeespanaentretantos_tcm7-458559.pdf.

Pogranichniy RM, Raizman E, Thacker HL, Stevenson GW. 2008. Prevalence and characterization of bovine viral diarrhoea virus in the white-tailed deer population in Indiana. *J Vet Diagn Invest* 20:71-74.

Ponsart C, Pozzi N, Bréard E, Catinot V, Viard G, Sailleau C, Viarouge C, Gouzil J, Beer M, Zientara S, Vitour D. 2014. Evidence of excretion of Schmallenberg virus in bull semen. *Vet Res* 45(1):37-42.

Porter SR, Czaplicki G, Mainil J, Guattéo R, Saegerman C. 2011. Q Fever: Current State of Knowledge and Perspectives of Research of a Neglected Zoonosis. *International Journal of Microbiology Article* ID248418:1-22.

Posado R, Bartolomé D, San Miguel JM, García JJ. 2013. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y Virus Respiratorio Sincitial Bovino en ganado de lidia en Salamanca. España. *Arch Zootec* 62(238):181-190.

Prieto M, Carmenes P, Álvarez M. 1988. Prevalencia de los anticuerpos contra el virus de la diarrea vírica bovina (BVD) y el herpesvirus bovino I (IBR-IPV) en el ganado vacuno lechero de la región asturiana (España). *XV Congreso Mundial de Buiatría, Palma de Mallorca*:896.

Pritchard DG. 1986. National situation of leptospirosis in the United Kingdom, In: Ellis WA, Little TWA (Eds) *Present state of leptospirosis diagnosis and control*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands:221-233.

Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis ovina y caprina 2017-2018. MAPAMA.

Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis Bovina 2018. MAPAMA.

Raaperi K, Orro T, Viltrop A. 2014. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. *Vet J* 201(3):249-256.

Rabinowitz P, Gordon Z, Chudnov D, Wilcox M, Odofoin L, Liu A, and Joshua Dein J. 2006. Animals as sentinels of bioterrorism agents. *Emerg Infect Dis* 12(4):647-652.

RAE. 2019. Diccionario de la lengua española. <http://dle.rae.es>.

Rasve 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Informe sobre la situación epidemiológica del virus de Schmallenberg. 2012. <http://rasve.mapa.es/Publica/InformacionGeneral/Enfermedades/enfermedades.asp>

- Rapley WA, Cranfield MR, Mehren KG, Vas SI, Barker IK, Lathe F. 1981. A natural outbreak of leptospirosis in a captive black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*) herd and in Dall's sheep (*Ovis dalli*) at the Metropolitan Toronto Zoo. In: Proc Am Assoc Zoo Vet Annu Meet 23:115-120
- Reyes-García R, Pérez de la Lastra JM, Vicente J, Ruiz-Fons F, Garrido JM, Gortazar C. 2008. Large-scale ELISA testing of Spanish red deer for paratuberculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology 124(1-2):75-81.
- Rijks JM, Roest HIJ, van Tulden PW, Kik MJL, IJzer J, Gröne A. 2011. *Coxiella burnetii* Infection in Roe Deer during Q Fever Epidemic, the Netherlands. Emerging Infectious diseases 17(12):2369-2371.
- Rinaldi L, Pacelli F, Iovane G, Pagnini U, Veneziano V, Fusco G, Cringoli G. 2007. Survey of *Neospora caninum* and bovine herpes virus 1 coinfection in cattle. Parasitol Res 100:359-364.
- Ridpath FF, Bolin SR, Dubovi EJ. 1994. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. Virology 205:66-74.
- Ridpath JF, Neill JD, Frey M, Landgraf JG. 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV. North America Veterinary Microbiology 77(1-2):145-155.
- Ridpath JF, Neill JD, Chase CCL. 2012. Impact of BVDV infection of white-tailed deer during second and third trimesters of pregnancy. Journal of Wildlife Diseases 48(3):758-762.
- Ridpath JF, Neill JD. 2016. Challenges in Identifying and Determining the Impacts of Infection with Pestiviruses on the Herd Health of Free Ranging Cervid Populations. Front Microbiol 7:article 921.
- Rivière J, Carabin K, Le Strat Y, Hendrikx P, Dufour B. 2014. Bovine tuberculosis surveillance in cattle and free-ranging wildlife in EU Member States in 2013: a survey-based review. Veterinary microbiology 173(3):323-331.
- Robinson, R.M., Hailey, T.L., Livingston, C.W., Thomas, J.W., 1967. Blue-tongue in the desert bighorn sheep. The Journal of Wildlife Management 31:165-168.
- Roebroeks W, Villa P. 2011. On the earliest evidence for habitual use of fire in Europe. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(13):5209-5214.
- Roehle PM, Woodward MJ, Edwards S. 1992. Characterisation of p20 gene sequences from a border disease-like pestivirus isolated from pigs. Veterinary Microbiology 33(1-4):231-238.
- Rodríguez-Prieto V, Kukielka D, Rivera-Arroyo B, Martínez-López B, de las Heras AI, Sánchez-Vizcaíno JM, Vicente J. 2016. Evidence of shared bovine viral diarrhea infections between red deer and extensively raised cattle in south-central Spain. BMC Veterinary Research 12:11.
- Rodríguez-Sánchez B, Gortázar C, Ruiz-Fons F, Sánchez-Vizcaíno JM. 2010. Bluetongue Virus Serotypes 1 and 4 in Red Deer, Spain. Emerging Infectious 16(3):518-520.

Roic B, Terzic S, Florijancic T, Prpic J, Ozimec S, Jemersic L, Boskovic I, Jungic A, Kero T. 2018. Preliminary Serological and molecular investigation of selected viral pathogens in croatian cervid species. *Acta Veterinaria-Beograd* 68(1):65-79.

Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. 1992. The family Herpesviridae: an update. *Arch Virol* 123:425-449.

Roizman B, Pellett PE. 2001. The family Herpesviridae: A brief introduction, in: Knipe D.M., Howley PM (Eds.), *Fields Virology* 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins publishers, Philadelphia:2381–2398.

Rojó Montejó S, San Miguel Ayanz JM, Vizuete Barrios JJ, Navarro Lozano V, Collantes Fernández E, Aduriz G, Ortega-Mora LM. 2013. Descripción de casos clínicos asociados a la infección por el virus de la enfermedad de Schmallenberg en granjas de vacuno de leche en la provincia de Toledo. XVIII Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina. Lleida 2013:196-198.

Rola J, Larska M, Socha W, Rola JG, Materniak M, Urban-Chmiel R, Thiry E, Żmudziński JF. 2017. Seroprevalence of bovine herpesvirus 1 related alphaherpesvirus infections in free-living and captive cervids in Poland. *Vet Microbiol* 204:77-83.

Romero L. 2018. Prevalencia IBR en España. El Futuro de las Medidas de Control de IBR en España MAPAMA. II Foro Ibérico de Vacuno. Zaragoza.

Ros C, Belak S. 2002. Characterization of the glycoprotein B gene from ruminant alphaherpesviruses. *Virus Genes* 24(2):99-105.

Rossi S, Gibert P, Hars J, Mastain O, Couteux P, Barbier S, Zenoni V, Novella C, Gueneau E, Gauthier D, Game Y, Chenouf N, Keck N, Breard E, Zientara S, Moinet M, Ballenghien T, Delecalle JC, Mathieu B, Mathevet P, Bost F. 2009. Circulation et impact du virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) chez les ruminants sauvages. Abstracts of the GEEFSM meeting: abstract book.

Rossi S, Pioz M, Beard E, Durand B, Gibert P, Gauthier D, Klein F, Maillard D, Saint-Andrieux C, Saubusse T, Hars J. 2014. Bluetongue Dynamics in French Wildlife: Exploring the Driving Forces. *Transboundary and Emerging Diseases* 61:e12–e24.

Rossi S, Viarouge C, Faure E, Gilot-Fromont E, Gache K, Gibert P, Verheyden H, Hars J, Klein F, Maillard D, Gauthier D, Game Y, Pozet F, Sailleau C, Garnier A, Zientara S, Breard E. 2017. Exposure of Wildlife to the Schmallenberg Virus in France (2011–2014): Higher, Faster, Stronger (than Bluetongue)! *Transboundary and Emerging Diseases* 64:354–363.

Rousset E, Sidi-Boumedine K, Thiery R. 2008. Q fever. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 2.1.12. World Organisation for Animal Health:13.

Rousset E, Berri M, Durand B. et al. 2009. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (2): 428-433.

Roy P. 2008. Molecular Dissection of Bluetongue Virus. *Animal Viruses: Molecular Biology*. Caister Academic Press:305–354.

Rúiz J, Jaime J, Vera V. 2008. Latencia del Herpesvirus Bovino-1: el papel de los transcriptos relacionados con latencia. *Acta biol Colomb* 13(1):3-22.

Ruiz-Fons F, Fernández de Mera IG, Acevedo P, Hofle U, Vicente J, de la Fuente J, Gortázar C. 2006. Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: Geographical and temporal distribution. *Veterinary Parasitology* 140(1-2):133-142.

Ruiz-Fons F, Rodríguez O, Torina A, Naranjo V, Gortázar C, de la Fuente J. 2008. Prevalence of *Coxiella burnetti* infection in wild and farmed ungulates. *Vet Microbiol* 126:282-286.

Ruiz-Fons F, Reyes-García AR, Alcaide V, Gortázar C. 2008. Spatial and Temporal Evolution of Bluetongue Virus in Wild Ruminants, Spain. *Emerging Infectious* 14(6):951-953.

Ruiz-Fons F, Astobiza I, Barandika JF, Hurtado A, Atxaerandio R, Juste RA, García-Pérez AL. 2010. Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems. *BMC Vet Res* 20(6):3.

Ruiz-Fons F, Sánchez-Matamoros A, Gortázar C, Sánchez-Vizcaíno JM. 2014. The role of wildlife in bluetongue virus maintenance in Europe: lessons learned after the natural infection in Spain. *Virus Res* 182:50–58.

Sadi, L Joyal R, St Georges M, Lamontagne L. 1991. Serologic survey of white-tailed deer on Anticosti Island, Quebec for Bovine Herpesvirus 1, Bovine Viral Diarrhea, and Parainfluenza 3. *Journal of Wildlife Diseases* 27(4):569-577.

Saito JK, Gribble DH, Berrios PE, Knight HD, Mc Kercher DG. 1974. A new herpesvirus isolate from goats: Preliminary report. *Am J Vet Res* 35:847-848.

San Miguel A; Roig S; González S. 2000. Efecto de mejoras pastorales sobre la dieta de una población de ciervos (*Cervus elaphus* L.) de Los Montes de Toledo pp:749-754. En S.E.E.P. y S.P.P.F. (Sociedade Portuguesa de Pastagens e Forragens) (Ed.) *Actas de la III Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes*. Bragança-A Coruña.

San Miguel-Ayaz A; Perea García-Calvo R; Fernández-Olalla M. 2010. Wild Ungulates vs. Extensive Livestock. Looking Back to Face the Future. *Options Méditerranéennes* 92:27-34.

San Miguel A; Rodríguez-Vigal C; Perea García-Calvo R. 2011. Los Quintos de Mora. Gestión integral del monte mediterráneo. En: López-Carrasco, C.; Rodríguez, M.P.; San Miguel, A.; Fernández, F.; Roig, S. 2011. *Pastos, paisajes culturales entre tradición y nuevos paradigmas del siglo XXI*. Visitas de campo pp:57-93. SEEP. Madrid. ISBN: 978-84-614-8713-4.

San Miguel A, Roig S, Perea R. 2017. The Pastures of Spain. *Pastos* 46(1):6-39.

San-Miguel JM, Álvarez G, Luzón M. 2001. Hypodermosis of red deer in Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 37(2):342-346.

San-Miguel JM, Álvarez G, Rodríguez-Vigal C, Luzón M. 2003. Nodular onchocercosis of red deer in central Spain. *Veterinary Parasitology* 114(1):75-79.

San Miguel JM, Gutiérrez-Expósito D, Aguado-Martínez A, González-Zotes E, Pereira-Bueno, J., Gómez-Bautista, M., Rubio, P., Ortega-Mora, L., Collantes-Fernández, E, Álvarez-García G. 2016. Effect of different ecosystems and management practices on *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in wild ruminants in Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 52(2):293-300.

San Miguel JM, García Peña FJ, García-Lunar P, Ortega-Mora LM, Ruano MJ, Gema Álvarez-García G, Collantes-Fernández E. 2017. Seroprevalence of Leptospirosis, Brucellosis, and Q Fever in a Wild Red Deer (*Cervus elaphus*) Population Kept in a Fenced Reserve in Absence of Contact with Livestock Vector-Borne and zoonotic diseases 17(10):692-697.

San Miguel JM. 2018. Directrices Generales en la Reducción del Uso de Antibióticos, Vacunación. Prevalencias, Bioseguridad y Correcta Antibioterapia. II Foro Ibérico de Vacuno. Zaragoza.

San Miguel JM, Gutiérrez-Expósito D, Collantes-Fernández E, Benavides-Silván J, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G. 2019. Surveillance for viral cattle pathogens in a closed red deer (*Cervus elaphus*) population evidences bovine viral diarrhoea virus (BVDV), bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) related alphaherpesvirus and blue tongue virus (BTV) circulation. In press.

Santos AS, Tilburg JJ, Botelho A, Barahona MJ, Nuncio MS, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CH. 2012. Genotypic diversity of clinical *Coxiella burnetii* isolates from Portugal based on MST and MLVA typing. *Int J Med Microbiol* 302:253-256.

Schimmer B, Morroy G, Dijkstra F. et al. 2008. Large ongoing Q fever outbreak in the south of The Netherlands. *Euro Surveillance* 13(7-9).

Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, Tomaso H, Vergnaud G, Le Flèche P, Whatmore AM, Dahouk S, Krüger M, Lodri C, Pfeffe M. 2008. Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerg Infect Dis* 14:1316-1317.

Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeiffer M, Huber B, Busse HJ, Kumar De B. 2010, *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:801-808.

Schonberg A, Brem S, Staak C, Kampe U. 1986. Leptospirosis in the Federal Republic of Germany. Preliminary results of a 1984 animal investigation program. In: Ellis WA, Little TWA (Eds) Present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands:205-209.

Scolamacchia F, Handel IG, Fèvre, EM, Morgan KL, Tanya VN, Bronsvoort BM. 2010. Serological patterns of brucellosis, leptospirosis and Q fever in *Bos indicus* cattle in Cameroon. *PLoS One* 21:8623.

Sedlak K, Girma T, Holejsovsky J. 2009. *Pestivirus* infections in cervids from the Czech Republic. *Veterinarni Medicina* 54(4):191-193.

Seixas LS, de Melo CB, Leite RC, Moreira EC, McManus CM, de Castro MB. 2011. Anti-Leptospira sp. agglutinins in ewes in the Federal District, Brazil. *Trop Anim Health Prod* 43:9-11.

Serrano E, Cross PC, Beneria M, Ficapal A, et al. 2011. Decreasing prevalence of brucellosis in red deer through efforts to control disease in livestock. *Epidemiol Infect* 139:1626-1630.

Sheffy BE, Davies DH. 1972. Reactivation of a bovine herpes virus after corticosteroid treatment. *Proc Soc Exp Biol Med* 140:974-976.

Simpson VR. 2002. Wild Animals as Reservoirs of Infectious Diseases in the UK. *The Veterinary Journal* 163:128-146.

Simmonds P, Becher P, Collett MS, Gould EA, Heinz FX, Meyers G, Monath T, Pletnev A, Rice CM, Stiasny K, Thiel HJ, Weiner A, Bukh J. 2012. Family Flaviviridae:1003-1020. In King A, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB (ed), *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA.

Smith KF, Sax DF, Gaines SD, Guernier V, Guégan JF. 2007. Globalization of human infectious disease. *Ecology* 88(8):1903-1910.

Smith GA, Young PL, Reed KC. 1995. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. *Arch Virol* 140:599-603.

Sobrinho R, Cabezón O, Millán J, Pabón M, Arnal MC, Luco DF, Gortázar C, Dubey JP, Almería S. 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 148:187-192.

Sobrinho R, Dubey JP, Pabón M, Linarez N, Kwok OC, Millán J, Arnal MC, Luco DF, Lopez-Gatius F, Thulliez P, Gortázar C, Almería S. 2008. Neospora caninum antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 155:190-197.

Soldati S, Kiupel M, Wise A, Maes R, Botteron C, Robert N. 2004. Meningoencephalomyelitis caused by *Neospora caninum* in a juvenile fallow deer (*Dama dama*). *J Vet Med A* 51:280-283.

Soriguer RC, Fandos P, Bernaldez E, Delibes JR. 1994. El Ciervo en Andalucía. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Dirección General de Desarrollo Forestal. Sevilla.

Spielman A, Wilson ML, Levine JF, Piesman J. 1985. Ecology of *Ixodes dammini-borne* human babesiosis and Lyme disease. *Ann Rev Entomol* 30:439-460.

Spreull J. 1905. Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. *J Comp Pathol* 18:321-337.

Squires RA, Wilson PR, Whelan NC, Johnstone AC, Ayanegui-Alcérreca MA, Castillo-Alcala F, Knight D. 2012. Alpha and gamma herpesvirus detection in two herds of farmed red deer (*Cervus elaphus*) in New Zealand. *N Z Vet J* 60:69-75.

St George TD, Philpott M. 1972. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. *Aust Vet J* 48(3):126.

Stieve E, Beckmen K, Kania SA, Widner A, Patton S. 2010. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibody prevalence in Alaska wildlife. *J Wildl Dis* 46:348-355.

Stocker T. (Ed.). 2014. Climate change 2013: the physical science basis: Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

- Stoddard RA. 2013. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *Methods Mol Biol* 943:257-266.
- Subharat S, Wilson PR, Heuer C, Collins-Emerson JM. 2011. Vaccination for leptospirosis improved the weaning percentage of 2-year-old farmed red deer hinds in New Zealand. *NZ Vet J* 59:191-196.
- Syrucsek L, Raska K. 1956. Q fever in domestic and wild birds. *Bulletin—World Health Organization* 15:329-337.
- Tagliabue S, Figarolli BM, D'Incau M, Foschi G, Gennero MS, Giordani R, Giordani R, Natale A, Papa P, Ponti N, Scaltrito D, Spadari L, Vesco G, Ruocco L. 2016. Serological surveillance of Leptospirosis in Italy: two-year national data (2010-2011) *Vet Ital* 52:129-138.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *Int J Parasitol* 30:1217-1258.
- Tessaro SV, Clavijo A. 2001. Duration of bluetongue viremia in experimentally infected American bison. *Journal of Wildlife Diseases* 37:722-729.
- Thiry E, Lemaire M. 2001. Infection de ruminants par des herpèsvirus hétérologues. *Point Vét* 207:20-25.
- Thiry J, Keuser V, Muylkens B, Meurens F, Gogev S, Vanderplasschen A, Thiry E. 2006. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet Res* 37:169-190.
- Thiry J, Widen F, Grégoire F, Linden A, Belák S, Thiry E. 2007. Isolation and characterisation of a ruminant alphaherpesvirus closely related to bovine herpesvirus 1 in a free-ranging red deer. *BMC Veterinary Research* 3:26.
- Tikoo SK, Campos M, Babiuk LA. 1995. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): Biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res* 45:191-223.
- Thorne ET 2001. Brucellosis. *In* Infectious diseases of wild mammals, 3rd Ed. (E.S. Williams & I.K. Barker, eds). Iowa State University Press, Ames, Iowa:372-395.
- Tissot-Dupont H, Raoult D, Brouqui P, Janbon F, Peyramond D, Weiller PJ, Chicheportiche C, Nezri M, Poirier R. 1992. Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients-323 French cases. *Am J Med* 93:427-434.
- Tissot-Dupont H, Torres S, Nezri M, Raoult D. 1999. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *Am J Epidemiol* 150:67-74.
- Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D. 2004. Wind in November. Q fever in December. *Emerg Infect Dis* 10:1264-1269.
- Tråvén M, Alenius S, Fossum C, Larsson B. 1991. Primary Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection in Calves Following Direct Contact with a Persistently Viraemic Calf. *Zoonoses and public health* 38(110):453-462.
- Trees AJ, Williams DJL. 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends in Parasitology* 21:558-561.

Truppel JH, Montiani-Ferreira F, Lange RR, Vilani RGOC, Reifur L, Boerger W, da Costa-Ribeiro MCV, Thomaz-Soccol V. 2010. Detection of *Neospora caninum* DNA in capybaras and phylogenetic analysis. *Parasitol Int* 59:376-379.

Tryland, M., Das Neves, C.G., Sunde, M., Mørk, T., 2009. Cervid herpes- virus 2: the primary agent in an outbreak of infectious keratoconjunctivitis (IKC) in semi-domesticated reindeer. *J. Clin. Microbiol* 47 (11):3707–3713.

Vale-Gonçalves HM, Cabral JA, Faria MC, Nunes-Pereira M, Faria AS, Veloso O, Vieira ML, Paiva-Cardoso Md. 2015. Prevalence of *Leptospira* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) from Northern Portugal: Risk factor analysis. *Epidemiol Infect* 18:1-5.

Van Campen H, Williams ES. 1996. Wildlife and bovine virus diarrhea virus: International Symposium Bovine Viral Diarrhea Virus-a 50 year review. Cornell University Press, Ithaca, NY:167-175.

Van Campen H, Frolich K, Hofmann M. Pestivirus infections. 2001. In: Williams ES, Barker IK, editors. Infectious diseases of wild mammals. 3rd edition. Ames (IA): Iowa State University Press:232-244.

Van Campen H, Ridpath J, Williams E, Cavender J, Edwards J, Smith S, Sawyer H. 2001. Isolation of bovine viral diarrhea virus from a free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*). *J Wildl Dis* 37(2):306-311.

Van Campen H, Rhyan J. 2010. The role of wildlife in diseases of cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26:147-161.

VanLeeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Scott HM. 2010. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. *Prev Vet Med* 93:129-138.

Van der Hoek W, Dijkstra F, Schimmer B, Schneeberger PM, Vellema P, Wijkmans C, ter Schegget R, Hackert V, van Duynhoven Y. 2010. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. *Euro Surveill* 15:12.

Van der Poel WH, Parlevliet JM, Verstraten ER, Kooi EA, Hakze-van der Honing R, Stockhofe N. 2014. Schmallenberg virus detection in bovine semen after experimental infection of bulls. *Epidemiol Infect* 142(7):1495-1500.

Vega S, Orden JA, García A, Pérez T, Ruiz- Santa-Quinteira JA, De la Fuente R. 2004. Seroprevalencia de anticuerpos frente al virus de la diarrea vírica bovina en el ganado bovino de la Comunidad Autónoma de Madrid. *Laboratorio Veterinario AVEDILA* 28:2-8.

Veldhuis AM, Carp-van Dijken S, van Wuijckhuise L, Witteveen G, van Schaik G. 2014. Schmallenberg virus in Dutch dairy herds: potential risk factors for high within-herd seroprevalence and malformations in calves, and its impact on productivity. *Vet Microbiol* 168(2-4):281-293.

Vianna MCB, Sreekumar C, Miska KB, Hill DE, Dubey JP. 2005. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet Parasitol* 129:253-257.

Vicente J, León-Vizcaíno L, Gortázar C, Cubero MJ, González M, Martín-Atance P. 2002. Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from Southcentral Spain J Wild Dis 38:649-652.

Victoriano AFB, Smythe LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjanarat K, Ong BL, Gongal G, Hall J, Coulombe CA, Yanagi-hara Y, Yoshida S, Adler B. 2009. Leptospirosis in the Asia Pacific region. BMC Infect Dis 9:147.

Vikoren T, Tharaldsen J, Fredriksen B, Handeland K. 2004. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild red deer, roe deer, moose, and reindeer from Norway Vet Parasitol 120:159-169.

Vilcek S, Nettleton PF. 2006. Pestiviruses in wild animals. Veterinary Microbiology 116:1-12.

Ward P, Glickman T, Guptill E. 2002. Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970–1998). J Am Vet Med Assoc 220:53-58.

Weigel RM, Dubey JP, Dyer D, Siegel AM, 1999. Risk Factors for infection with *Toxoplasma gondii* for residents and workers on swine farms in Illinois, USA. Am J Trop Med Hyg 60:793-798.

Werdin RE, Ames TR, Sagar M, Goyal J. 1989. Detection and elimination of carrier animals in a dairy herd persistently infected with bovine viral diarrhea virus Vet Diagn Invest 1:277-279.

Wernike K, Eschbaumer M, Breithaupt A, Hoffmann B, Beer M. 2012. Schmallerberg virus challenge models in cattle: infectious serum or culture-grown virus? Vet Res 43(1):84-87.

Wernike K, Eschbaumer M, Schirrmeier H, Blohm U, Breithaupt A, Hoffmann B, Beer M. 2013a. Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallerberg virus in cattle. Vet Microbiol 165(1-2):155-159.

Wernike K, Hoffmann B, Bréard E, Botner A, Ponsart C, Zientara S, Lohse L, Pozzi N, Viarouge C, Sarradin R, Leroux-Barc C, Riou M, Laloy E, Breithaupt A, Beer M. 2013b. Schmallerberg virus experimental infection of sheep. Vet Microbiol 166(3-4):461-466.

Wernike K, Conraths F, Zanella G, Granzow H, Gache K, Schirrmeier H, Valas S, Staubach C, Marianneau P, Kraatz F, Höreth-Böntgen D, Reimann I, Zientara S, Beer M. 2014a. Schmallerberg virus-Two years of experiences 116(4):423-434.

Wernike K, Holsteg M, Schirrmeier H, Hoffmann B, Beer M. 2014b. - Natural infection of pregnant cows with Schmallerberg virus: a follow-up study. PLoS ONE 9(5):e98223.

Wernike K, Elbers A, Beer M. 2015. Smallerberg virus Infection. Rev Sci Tech Off Int Epiz 34(2):363-373.

Wernike K, Holsteg M, Szillat KP, Beer M. 2018. Development of within-herd immunity and long-term persistence of antibodies against Schmallerberg virus in naturally infected cattle. BMC Veterinary Research 14:368.

Whetstone CA, Miller JM. 1989. Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. Arch Virol 107:27-34.

WHO/OMS. 2010. Report of the First Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. Ginebra, Suiza.

WHO/OMS. 2011. Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. Ginebra, Suiza.

Wilson JA, Mellor PS. 2009. Bluetongue in Europe: past, present and future. Phil Trans R Soc B 364:2669-2681.

Wolf A, Cowen D, Paige B. 1939. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. Science 89:226-227.

Woods LW, Anderson ML, Swift PK, Sverlow KW. 1994. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). J Vet Diagn Investig 6:508-510.

Wyler R, Engels R, Schwyzer M. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: G. Wittmann (Ed.) Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs. Developments in veterinary virology, Kluwer Academic Publishers, Boston:1-72.

Yon L, Duff JP, Ágren EO, Erdélyi K, Ferroglio E, Godfroid J, Hars J, Hestvik G, Horton D, Kuiken T, Lavazza A, Markowska-Daniel I, Martel A, Neimanis, Pasmans F, Price S, Ruiz-Fons F, Ryser-Degiorgis MP, Widén F, Gavier-Widén D. 2019. Recent changes in infectious diseases in European wildlife. Journal of Wildlife Diseases 55(1):1-41.

Zientara S, Sánchez-Vizcaino JM. 2013. Control of bluetongue in Europe. Veterinary Microbiology 165(1–2):33-37.

CAPÍTULO VIII

Anexos: Artículos científicos

Anexo 1

EFFECT OF DIFFERENT ECOSYSTEMS AND MANAGEMENT PRACTICES ON *TOXOPLASMA GONDII* AND *NEOSPORA CANINUM* INFECTIONS IN WILD RUMINANTS IN SPAIN

José M. San Miguel,¹ Daniel Gutiérrez-Expósito,² Adriana Aguado-Martínez,² Elena González-Zotes,² Juana Pereira-Bueno,³ Mercedes Gómez-Bautista,² Pedro Rubio,³ Luis M. Ortega-Mora,² Esther Collantes-Fernández,² and Gema Álvarez-García^{2,4}

¹ Zoetis, Av. Europa 20B, Alcobendas, 28108 Madrid, Spain

² Salud Veterinaria y Zoonosis, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

³ Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, University of León, 24071 León, Spain

⁴ Corresponding author (email: gemaga@ucm.es)

ABSTRACT: *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* are two major abortifacient protozoans in domestic small ruminants and cattle, respectively, and they also parasitize a wide range of wildlife. Numerous serosurveys have been conducted in wild ruminants worldwide. However, the potential effect of different ecosystems and management practices on these infections has not been investigated. We studied the prevalence of antibodies to *T. gondii* and *N. caninum* in wild ruminants between 2007 and 2012 from four national wildlife reserves: three open space reserves in northwest Spain (Ancares, Mampodre, and Riaño) and a fenced reserve in central Spain (Quintos de Mora). Sera from roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*) were collected in Ancares (roe deer), Mampodre (both species), and Riaño (both species), whereas red deer (*Cervus elaphus*) sera were collected only in Quintos de Mora. The results of immunofluorescence antibody tests showed a *T. gondii* antibody prevalence significantly higher in red deer (13%; 17/131) than in roe deer (2%; 5/228) and chamois (4%; 6/149) ($P < 0.05$, Fisher's exact test). Moreover, *N. caninum*-specific antibodies were only detected in 1% of animals (2/131 red deer, 2/228 roe deer, and 2/149 chamois). Management measures were implemented in the Quintos de Mora reserve and *T. gondii* antibody prevalence in red deer decreased from 13% to 2% after 5 yr. In contrast, *N. caninum* antibody prevalences were very low (<2%) over the years. The results suggest a low frequency of sylvatic life cycles in the hunting reservations studied, so interconnection between sylvatic and domestic life cycles is unlikely. Regardless, a sustainable exploitation of natural resources in wildlife reserves may help to reduce the prevalence of *T. gondii* infection.

Key words: Chamois, management measures, *Neospora caninum*, red deer, roe deer, seroprevalence, Spanish wildlife reserves, *Toxoplasma gondii*.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are closely related intracellular protozoan parasites distributed worldwide (Bojar and Szymanska 2010; Dubey and Schares 2011). They have heteroxenous life cycles, in which the definitive hosts are domestic cats (*Felis catus*; Frenkel et al. 1970) and other wild felids for *T. gondii* (Tenter et al. 2000) and dogs (*Canis lupus familiaris*), grey wolves (*Canis lupus*), coyotes (*Canis latrans*), and dingoes (*Canis lupus dingo*) for *N. caninum*. A wide range of warm-blooded animals can act as intermediate hosts of *T. gondii*, whereas *N. caninum* infects a more limited range of intermediate hosts (reviewed by Dubey and Schares 2011). *Toxoplasma gondii* and *N.*

caninum infections are causes of reproductive failure in small ruminants (Masala et al. 2007) and cattle (Dubey 2003), respectively, with significant economic impact. Moreover, *T. gondii* is an important zoonosis, and up to a third of the world's human population may be infected. Infection is mainly acquired by ingestion of food or water that is contaminated with oocysts shed by cats or by eating undercooked or raw meat containing tissue cysts (Dubey and Jones 2008).

There is increased interest in investigating the role of wild ruminants in sylvatic life cycles. European wild ruminant populations have grown considerably (Apollonio et al. 2010). Studies in northern Spain have shown evidence of a large resurgence in ungulate

populations (Gortázar et al. 2000). This is most likely due to the abandonment of agricultural fields, the advance of forests, and the implementation of hunting management practices (Acevedo et al. 2005). Hunting is a relevant and traditional activity with an important economic impact. Game is consumed by hunters and their families and is sold to some restaurants and stores. Consequently, game consumption and the handling of wild animals by hunters are potential sources of *T. gondii* infection to humans (Tenter et al. 2000). Jenkins et al. (2015) brought *T. gondii* to be the attention of the One Health community. In addition, the European Food Safety Authority (EFSA 2006) cited a need to improve the surveillance and monitoring of *T. gondii* in animals and food products for human consumption to better evaluate the risk of toxoplasmosis in member states. Antibodies to *T. gondii* and *N. caninum* have been reported in various wild ruminant species, suggesting widespread exposure (Dubey and Jones 2008; Dubey and Schares 2011). In Spain, such information remains relatively scarce, and some studies were based on limited sample sizes and areas (Gauss et al. 2006; Gamarra et al. 2008; Panadero et al. 2010). However, the detection of specific antibodies in red deer (*Cervus elaphus*), Barbary sheep (*Ammotragus lervia*), roe deer (*Capreolus capreolus*), and Iberian wild goat (*Capra pyrenaica hispanica*) suggests that sylvatic and domestic life cycles may be interconnected and impact the prevalence of both infections in cattle and small ruminant herds (Panadero et al. 2010; García-Bocanegra et al. 2012; Almería and López-Gatius 2013; García-Bocanegra et al. 2013). The potential effect of different ecosystems and management practices on both infections has not been investigated.

We measured the prevalence of antibodies to *T. gondii* and *N. caninum* in Spanish red deer, roe deer, and chamois (*Rupicapra rupicapra*) in four national wildlife reserves with controlled hunting. We repeated the serosurvey in the only fenced reserve 5 yr after implementation of management measures and noted the effect of management

changes on prevalence. We also evaluated age and sex data in red deer.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

Toxoplasma gondii and *N. caninum* antibody surveys were conducted in red deer, roe deer, and chamois in 2007 from four Spanish hunting reserves (Quintos de Mora, Riaño, Mampodre, and Ancares) under different management systems. Quintos de Mora (39°24'23"N, 4°4'19"W) is a fenced and controlled hunting national reserve where there are no domestic animals. Riaño (43°20'0"N, 5°43'0"W), Mampodre (43°2'21"N, 5°7'1"W), and Ancares (42°50'35"N, 6°49'54"W) are open hunting reservations, where wild animals may share pasture with domestic animals including cattle, sheep, and goats. Roe deer were sampled in Riaño, Mampodre, and Ancares; chamois were sampled in Riaño and Mampodre; and red deer were only sampled in Quintos de Mora (Fig. 1 and Table 1).

After this first sampling, we implemented changes in the management system of the Quintos de Mora reserve, and repeated the serosurvey in the red deer population 5 yr later (2012). The new management system included a reduction in the red deer population from 2,500 to 1,700 animals via controlled selective hunting. In addition, we replaced traditional food supplementation in fixed troughs during the dry season with the opening of fenced grazing areas to guarantee sufficient food.

Blood samples were collected directly from the bullet wound, jugular vein, or heart when the thoracic cavity was opened during necropsies. Blood was collected in plastic tubes and serum was obtained after centrifugation and stored at -20 C until analysis. Both anti-*T. gondii* and -*N. caninum* specific antibodies were detected by the immunofluorescence antibody technique (IFAT) as described in the upcoming text. Age and sex data were recorded for red deer from the Quintos de Mora reserve. Age was determined by morphologic and metric variables of the canine teeth (d'Errico and Vanhaeren 2002).

Sampling areas

Quintos de Mora is a fenced hunting reservation of 6.86 ha in the province of Toledo (central Spain; Fig. 1) that comprises an extended plain at 800 m above sea level and a mountainous area that reaches 1,200 m. It is a Mediterranean scrubland with holm oak (*Quercus ilex*) as the most representative tree. The climate is mild (average temperature of the coldest month between 0 C and 18 C) with a hot (average temperature in the

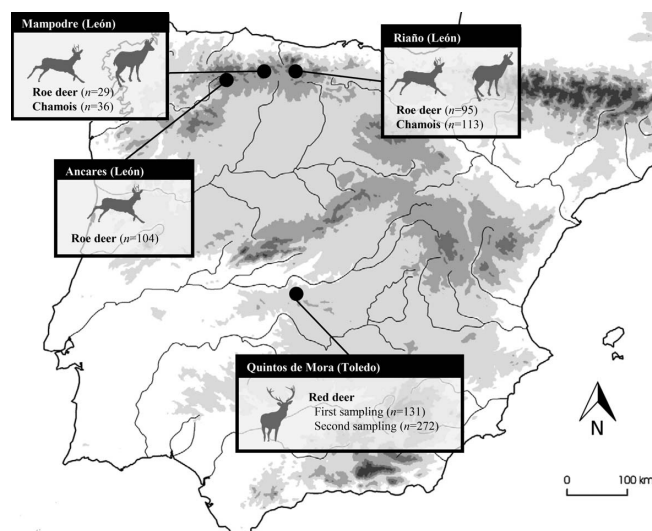


FIGURE 1. Location of the Spanish national reserves where serum samples were collected from red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus capreolus*), and chamois (*Rupicapra rupicapra*) to determine the prevalence of antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in 2007 (first sampling) and 2012 (second sampling).

hottest month above 22 C) and dry summer, and the humid season mainly comprises winter (“Csa” following the climate classification of Köppen-Geiger) (Kottek et al. 2006). The representative mammals are game species, mainly red deer and wild boar (*Sus scrofa*) but also some fallow deer (*Dama dama*), roe deer, and wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), as well as carnivores including foxes (*Vulpes vulpes*), wild cats (*Felis sylvestris*), genets (*Genetta genetta*), and several mustelid carnivores such as badger (*Meles meles*), polecat (*Mustela putorius*), beech marten (*Martes foina*), and weasel (*Mustela nivalis*).

Riaño, Mampodre, and Ancares are located in northwestern Spain in the province of León (Fig. 1). They are mountainous regions with a cold climate (average temperature of the coldest month below 0 C) and a mild (average temperature in the hottest month below or equal to 22 C and with 4 mo or more with average temperatures above 10 C) and dry summer (“Dsb” following the climate classification of Köppen-Geiger). Areas with the lowest altitude have a mainly mild climate (average temperature of the coldest month between 0 C and 18 C) with a mild and dry summer (“Csb” based on climate classification of Köppen-Geiger) (Iberian climate Atlas, Agencia Estatal de Meteorología). In these areas the humid season comprises autumn, winter, and spring. The highest peaks reach 2,000 m. The flora is characterized by

broad grazing areas and woodland with beeches (*Fagus sylvatica*), holly trees (*Ilex aquifolium*), and birch (*Betula celtiberica*), among others. Five game mammals can be found in these regions: red deer, roe deer, chamois, Iberian ibex (*Capra pyrenaica hispanica*), and wild boar. The carnivore species are mainly the wild cat and some mustelids, such as the European pine marten (*Martes martes*) and the beech marten. The brown bear (*Ursus arctos arctos*) can be found in Ancares and Riaño, and the wolf is also frequently found.

Parasites and antigen preparation

Toxoplasma gondii tachyzoites of the Tg-Me 49 strain and *N. caninum* tachyzoites of the Nc-1 isolate were maintained in vitro by serial passages in Marc145 cells as described by Pérez-Zaballos et al. (2005). The tachyzoites from cell culture were scraped, passed by 21-gauge needles, and harvested by centrifugation. The pellet of tachyzoites was washed twice and counted in a Neubauer chamber, excluding nonviable tachyzoites by trypan blue vital dye. The tachyzoites were finally resuspended at a final concentration of 10^7 /mL. For IFATs, formaldehyde was added to the tachyzoite suspension at a final concentration of 0.2%, and formalin-fixed tachyzoites were aliquoted and stored at 4 C until use.

TABLE 1. Prevalence of (number positive/number tested) antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus capreolus*), and chamois (*Rupicapra rupicapra*) from four national reserves in Spain and immunofluorescent antibody test (IFAT) titer distribution in antibody-positive animals. Immunofluorescent antibody test titers are expressed as the highest dilution giving a positive test result. Results corresponded to the first sampling (2007) before the implementation of new management measures.

Animal species	Parasite	Reserve				IFAT titers ^a			
		Quintos de Mora	Ancares	Mampodre	Riaño	100	200	400	800
Red deer	<i>T. gondii</i>	13% (17/131)				71% (12/17)	24% (4/17)	6% (1/17)	—
	<i>N. caninum</i>	2% (2/131)				100% (2/2)	—	—	—
Roe deer	<i>T. gondii</i>			3% (1/29)	4% (4/95)	80% (4/5)	—	—	20% (1/5)
	<i>N. caninum</i>		0.0% (0/104)	0% (0/29)	0% (0/95)	100% (2/2)	—	—	—
Chamois	<i>T. gondii</i>		2% (2/104)	6% (2/36)	4% (4/113)	33% (2/6)	50% (3/6)	17% (1/6)	—
	<i>N. caninum</i>			0% (0/36)	2% (2/113)	100% (2/2)	—	—	—

^a The percentage of each IFAT titer was calculated over the total number of positive samples (IFAT titers ≥ 100).

Immunofluorescence antibody tests

Sera were analyzed by both *T. gondii* and *N. caninum* tachyzoite-based IFAT tests in double serial dilutions starting at 1:50 following the method of Fernández-García et al. (2009). The fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-deer immunoglobulin G (IgG) antibody conjugate (02-31-06 KPL, Gaithersburg, Maryland, USA) at a 1:30 dilution for red deer and roe deer and an FITC-labeled anti-bovine IgG (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) at a 1:150 dilution for serum samples from chamois (Gutiérrez-Expósito et al. 2013) were used as secondary antibodies. The slides were examined under a fluorescence microscope (Nikon-Optiphot 229992, Tokyo, Japan). Samples were considered positive for *N. caninum* and *T. gondii* if sera had specific fluorescence at a dilution of $\geq 1:100$ (Stieve et al. 2010); a specific fluorescence at 1:50 was considered negative.

Data analysis

The prevalence of antibodies to *T. gondii* and *N. caninum* was estimated from the ratio of positive samples (titer ≥ 100) to the total number of samples. Prevalences in red deer were calculated according to age and sex. Animals were classified as juveniles (<1 yr), young adults (1–2 yr), and adults (>2 yr). In roe deer and chamois, only geographic location was obtained. Significance of differences in prevalences was tested by Fisher's exact or χ^2 tests, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

On first sampling, *T. gondii* antibody prevalence was significantly higher in red deer (13%; 17/131) than in roe deer (2%; 3/228) and chamois (4.0%; 6/149) ($P < 0.05$, Fisher's exact test), with titers that ranged from 100 to 800 (Table 1). The great majority of titers were 100 or 200; only one titer (in a roe deer) was 800. Titers of positive chamois were 100 to 400. *Neospora caninum*-specific antibody was detected in 6 of 508 (1%) samples analyzed from red deer (2/131), roe deer (2/228), and chamois (2/149); all with titers of 100.

No differences in the prevalence of antibodies to either *T. gondii* or *N. caninum* were found between northwest and central Spain reserves ($P > 0.05$, χ^2 test). There were no significant differences in antibody prevalences among the Ancares, Mampodre, and Riaño

TABLE 2. Prevalence (% , number of positive/number tested) of antibody to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in red deer (*Cervus elaphus*) from Quintos de Mora reserve according to age and sex corresponding to the first sampling (2007).

Variables and categories	<i>T. gondii</i>	<i>N. caninum</i>
Age (years)		
<1	7% (2/30)	0% (0/30)
1–2	18% (6/34)	0% (0/34)
Adults (>2)	13% (9/67)	3% (2/67)
Sex		
Male	14% (10/73)	0% (0/73)
Female	12% (7/58)	3% (2/58)

reserves for roe deer ($P>0.05$, χ^2 test) nor between the Mampodre and Riaño reserves for chamois ($P>0.05$, Fisher's exact test).

When the red deer population at Quintos de Mora was resampled after the implementation of new management measures, *T. gondii* antibody prevalence had decreased from 13% (17/131) to 2%, (5/272) in the second sampling ($P<0.05$, χ^2 test). Titers corresponded to 100 (3/5), 200 (1/5), and 400 (1/5). Antibodies against *N. caninum* in red deer did not change over the years, and low prevalences (<2% were found in both samplings; 1.5% and 0.4% at the first and second samplings, respectively) ($P>0.05$, χ^2 test). In the second sampling only one red deer had an IFAT titer of 100.

No differences in the prevalences for *T. gondii* and *N. caninum* antibodies were found among age classes; $P>0.05$, χ^2 test) or sexes of red deer ($P>0.05$, χ^2 test; Table 2). In the second sampling *T. gondii* antibody-positive animals included 2/102 males and 3/170 females; only 1/107 females was *N. caninum* antibody-positive. One of 54 <1-yr-old animals was *T. gondii* antibody-positive; one of 37 1–2-yr-olds was *T. gondii* antibody-positive and one was *N. caninum* antibody-positive; three of 181 adults were *T. gondii* antibody-positive.

DISCUSSION

Neospora caninum and *T. gondii* are two relevant abortifacients in domestic ruminants,

and both infections are highly prevalent in Spain. Studies in wildlife suggested an inter-connection between the domestic and sylvatic life cycles (Almería and López-Gatius 2013). In this context, we studied the relevance of both sylvatic life cycles in wild ruminant species in three open and one fenced regional hunting reservations. Thus, a large number of red deer, roe deer, and chamois were tested for specific antibodies against *T. gondii* and *N. caninum*. In addition, the impact of a new management system implemented in the fenced hunting reserve (Quintos de Mora) on the prevalence rates of both protozoan infections was investigated in the red deer population. Antibody prevalences were low for both parasitic infections regardless of animal species, geographic region, and the sampling period studied. Remarkably, prevalences reported here were significantly lower than those reported in other European areas, including Spanish ecosystems (Gaffuri et al. 2006; Bartova et al. 2007; Gozdzik et al. 2010; De Craeye et al. 2011; Dubey and Schares 2011; Malmsten et al. 2011). In Spain, *T. gondii* antibody prevalences varied in red deer from 11.7% to 44.2% depending on geographic region (Gauss et al. 2006). For roe deer, Gamarra et al. (2008) reported 39.2% prevalence by modified agglutination test (MAT) and found significant differences between coastal and arid habitats, with high and low roe deer densities, respectively. In chamois, 20% antibody prevalences from northern Spain (Asturias) were also found (Gauss et al. 2006). In a serosurvey of *N. caninum* infection in red deer and roe deer by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in central and southern Spain Almería et al. (2007) reported prevalences <12%.

However, it is difficult to compare studies due to differences in habitat, presence of domestic or wild definitive hosts, climate and soil, experimental designs, and serologic techniques. The most commonly used techniques in *N. caninum* and *T. gondii* serodiagnosis are MAT, ELISA, and IFAT. Due to the lack of sensitivity and specificity data on these tests when using sera from wild ruminants, we selected the conservative cut-off titer of 100 as

used by Stieve et al. (2010). In addition, we chose the same serologic technique and cut-off for both parasite species to make the results more comparable. In this scenario, a widely accepted diagnostic procedure should be highly recommended in order to better know the impact of these parasitic diseases in wildlife (Donahoe et al. 2015).

The low prevalences detected in our study, especially in the three open hunting reservations, were unexpected given that both parasitic infections are highly prevalent in domestic ruminants. Bovine neosporosis is currently the greatest cause of infectious abortion in Spanish cattle, and the prevalence in cattle is still significantly higher in north-western Spain compared to other European countries (Bartels et al. 2006; Eiras et al. 2011). Similarly, *T. gondii* infection is wide spread in small domestic ruminants. In particular, close to the Mampodre, Ancares, and Riaño reserves, individual infection prevalences of 46.1% and 54.5% were found in sheep (*Ovis aries*) and goats (*Capra aegagrus hircus*), respectively (Ortega-Mora et al. 2006), whereas *T. gondii* infection was diagnosed in 23.1% of the ovine aborted fetuses from different points of northern and ventral Spain (Pereira-Bueno et al. 2004). *Neospora caninum* infection also seems to play a role in abortions in small ruminants in Spain (Moreno et al. 2012; González-Warleta et al. 2014).

Our results showed that both sylvatic life cycles may not be relevant in the sampled regions, supported by the low antibody prevalences found (<5%). Surprisingly, the highest *T. gondii* antibody prevalence (12.9%) was found in red deer in the first sampling in Quintos de Mora, a fenced area that prevents wildlife from contact with domestic ruminants, in contrast to the other three reserves, where domestic and wild ruminants share pastures. The prevalence significantly decreased to 2% after 5 yr, probably due to improved management of hunting resources in Quintos de Mora. In particular, natural vegetation grown in fenced areas (unlikely to be contaminated with oocysts) during the humid season was available for animals during the dry season instead of supplemental food

(pellet feed) in fixed troughs to guarantee enough food supply. High animal density around fixed troughs may negatively affect animal health by favoring the spread of other infectious or parasitic diseases (e.g., helminth infections) and by contributing to stress-associated immunosuppression (Davidson et al. 2014). Moreover, the number of red deer per hectare was reduced by means of controlled selective hunting. Both measures ensured better optimization of natural resources and better preservation of Mediterranean forest, and might also explain the reduction of *T. gondii* antibody prevalence between samplings. As domestic cats are unlikely to be present in Quintos de Mora, prevalence rates might be explained by the existence of wild cats acting as the definitive host in this ecosystem (Lukesova and Literak 1998). Indeed, anti-*T. gondii*-specific antibodies were previously reported in wild cats in Spain (Sobrino et al. 2007).

There were no significant differences of prevalences of either infection with age or sex, which may be due to the low prevalences found. Previous authors found that *T. gondii* antibody prevalence increased with age due to the higher chance of being infected with oocysts from the environment. In our study the highest prevalences were found in animals >1 yr old. Moreover, we confirmed that in the natural environment, wild animals are more exposed to *T. gondii* than to *N. caninum* (Panadero et al. 2010; Malmsten et al. 2011), probably due to decreased frequency of horizontal transmission of *N. caninum*. Indeed, it has been widely postulated that *N. caninum* infection is mainly maintained by transplacental transmission versus the horizontal transmission of *T. gondii* through ingestion of food and water contaminated with sporulated oocysts (Gaffuri et al. 2006; Gamarra et al. 2008; De Craeye et al. 2011).

The antibody prevalences reported in open hunting reservations (Ancares, Mampodre, and Riaño), where wild ruminants may interact with domestic animals, were similarly low in roe deer and chamois regardless of different geographic characteristics. These results could be due to the low density of

felids in these sampled areas and the absence of human activity. In northwestern Spain, interaction between *N. caninum* domestic and sylvatic cycles might occur because *N. caninum* infection was detected in roe deer (13.7%), in cattle sharing pastures (Panadero et al. 2010), and in some wild carnivores (Sobrino et al. 2008). However, in this study, antibody prevalence in roe deer was also very low. A shortage of definitive hosts, very low oocyst shedding and, subsequently, less frequent horizontal transmission could explain the low *N. caninum* prevalence in wild ruminants. However, high-to-moderate prevalences have been described in some Spanish carnivores that might be involved in the sylvatic life cycle (Gauss et al. 2006; Millán et al. 2009; Panadero et al. 2010).

In summary, we found a low frequency of sylvatic life cycles in all hunting reservations studied, indicating that an interconnection between sylvatic and domestic life cycles in open-space hunting reserves is unlikely. Despite low *T. gondii* antibody prevalences in these regions, there is still a potential risk of humans acquiring infection through game meat consumption. Finally, a sustainable exploitation of natural resources avoiding food supply has shown to be efficient in reducing the prevalence of *T. gondii* infection in wild ruminants.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by Salud Veterinaria y Zoonosis research group's resources. We thank Consejería de Agricultura, Medio Ambiente y Desarrollo Rural de Castilla la Mancha, and Consejería de Fomento y Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León for institutional authorization to collect the samples. We also thank Agustín Gutiérrez-Sierra, Carlos Rodríguez-Vigal, Angel Moreno Gómez, and staff of Quintos de Mora for their collaboration in sampling.

LITERATURE CITED

- Acevedo P, Delibes-Mateos M, Escudero MA, Vicente J, Marco J, Gortázar C. 2005. Environmental constraints in the colonization sequence of roe deer (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) across the Iberian Mountains, Spain. *J Biogeogr* 32:1671–1680.
- Almería S, López-Gatius F. 2013. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. *Res Vet Sci* 95:303–309.
- Almería S, Vidal D, Ferrer D, Pabón M, Fernández-de-Mera MI, Ruiz-Fons F, Alzaga V, Marco I, Calvete C, Lavín S, et al. 2007. Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain. *Vet Parasitol* 143:21–28.
- Apollonio M, Anderson R, Putman R. 2010. *European ungulates and their management in the 21st century*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 618 pp.
- Bartels CJ, Arnaiz-Seco JI, Ruiz-Santa-Quitera A, Bjorkman C, Frossling J, Von BD, Conraths FJ, Schares G, Van MC, Wouda W, et al. 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, the Netherlands, Spain and Sweden. *Vet Parasitol* 137:17–27.
- Bartova E, Sedlak K, Pavlik I, Literak I. 2007. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in wild ruminants from the countryside or captivity in the Czech Republic. *J Parasitol* 93:1216–1218.
- Bojar I, Szymanska J. 2010. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*—State of the art. *Ann Agric Environ Med* 17:209–214.
- Davidson RK, Kutz SJ, Madslie K, Hoberg E, Handeland K. 2014. Gastrointestinal parasites in an isolated Norwegian population of wild red deer (*Cervus elaphus*). *Acta Vet Scand* 56:59.
- De Craeye S, Speybroeck N, Ajzenberg D, Darde ML, Collinet F, Tavernier P, Van Gucht S, Dorny P, Dierick K. 2011. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wildlife: Common parasites in Belgian foxes and *Cervidae*? *Vet Parasitol* 178:64–69.
- D'Errico F, Vanhaeren M. 2002. Criteria for identifying red deer (*Cervus elaphus*) age and sex from their canines. Application to the study of upper palaeolithic and mesolithic ornaments. *J Archaeol Sci* 29:211–232.
- Donahoe E, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, Šlapeta J. 2015. A review of neosporosis and pathological findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *Int J Parasitol Parasit Wildl* 4:216–238.
- Dubey JP. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol* 41:1–16.
- Dubey JP, Jones JL. 2008. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol* 38:1257–1278.
- Dubey JP, Schares G. 2011. Neosporosis in animals—The last five years. *Vet Parasitol* 180:90–108.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2007. Review of the community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2005. *EFSA J* 600:1–32.
- Eiras C, Arnaiz I, Álvarez-García G., Ortega-Mora LM, Sanjuán ML, Yus E, Dieguez FJ. 2011. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. *Prev Vet Med* 98:128–132.
- Fernández-García A, Álvarez-García G, Risco-Castillo V, Aguado-Martínez A, Marugán-Hernández V, Ortega-

- Mora LM. 2009. Pattern of recognition of *Besnoitia besnoiti* tachyzoite and bradyzoite antigens by naturally infected cattle. *Vet Parasitol* 164:104–110.
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167:893–896.
- Gaffuri A, Giacometti M, Tranquillo VM, Magnino S, Cordioli P, Lanfranchi P. 2006. Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian Alps. *J Wildl Dis* 42:685–690.
- Gamarra JA, Cabezón O, Pabón M, Arnal M.C, Luco DF, Dubey JP, Gortázar C, Almería S. 2008. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in roe deer from Spain. *Vet Parasitol* 153:152–156.
- García-Bocanegra I, Cabezón O, Hernández E, Martínez-Cruz MS, Martínez-Moreno A, Martínez-Moreno J. 2013. *Toxoplasma gondii* in ruminant species (cattle, sheep, and goats) from southern Spain. *J Parasitol* 99:438–440.
- García-Bocanegra I, Cabezón O, Pabón M, Gómez-Guillamón F, Arenas A, Alcaide E, Salas-Vega R, Dubey JP, Almería S. 2012. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*). *Vet J* 191:257–260.
- Gauss CBL, Dubey JP, Vidal D, Cabezón O, Ruiz-Fons F, Vicente J, Marco I, Lavín S, Gortázar C, Almería S. 2006. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in roe deer (*Cervus elaphus*) and other wild ruminants from Spain. *Vet Parasitol* 136:193–200.
- González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Regidor-Cerrillo J, Benavides J, Alvarez-García G, Fuertes M, Ortega-Mora LM, Mezo M. 2014. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. *Vet Res* 45:88.
- Gortázar C, Herrero J, Villafuerte R, Marco J. 2000. Historical examination of the status of large mammals in Aragón, Spain. *Mammalia* 64:411–422.
- Gozdzik K, Jakubek EB, Bjorkman C, Bien J, Moskwa B, Cabaj W. 2010. Seroprevalence of *Neospora caninum* in free living and farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Poland. *Pol J Vet Sci* 13:117–120.
- Gutiérrez-Expósito D, Ortega-Mora LM, Marco I, Boadella M, Gortázar C, San Miguel-Ayán JM, García-Lunar P, Lavín S, Alvarez-García G. 2013. First serosurvey of *Besnoitia* spp. infection in wild European ruminants in Spain. *Vet Parasitol* 197:557–564.
- Jenkins EJ, Simon A, Bachand N, Stephen C. 2015. Wildlife parasites in a One Health world. *Trends Parasitol* 31:174–180.
- Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel, F. 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification update. *Meteorologische Zeitschrift* 15:259–263.
- Lukesova D, Literak I. 1998. Shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by *Felidae* in zoos in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 74:1–7.
- Malmsten J, Jakubek EB, Bjorkman C. 2011. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in moose (*Alces alces*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Sweden. *Vet Parasitol* 177:275–280.
- Masala G, Porcu R, Daga C, Denti S, Canu G, Patta C, Tola S. 2007. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J Vet Diagn Invest* 19:96–98.
- Millán J, Cabezón O, Pabón M, Dubey JP, Almería S. 2009. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in feral cats (*Felis silvestris catus*) in Majorca, Balearic Islands, Spain. *Vet Parasitol* 165:323–326.
- Moreno B, Collantes-Fernández E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM. 2012. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet Parasitol* 187:312–318.
- Ortega-Mora LM, Fernández-García A, Gómez-Bautista M. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitol* 51:1–14.
- Panadero R, Páncera A, López C, Vázquez L, Paz A, Díaz P, Dacal V, Cienfuegos S, Fernández G, Lago N, et al. 2010. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (northwest Spain). *Res Vet Sci* 88:111–115.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Perez-Perez V, Alvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM. 2004. Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet Parasitol* 121:33–43.
- Pérez-Zaballos FJ, Ortega-Mora LM, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Navarro-Lozano V, García-Villada L, Costas E. 2005. Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: An argument in favor of its clonal population structure. *J Parasitol* 91:507–510.
- Sobrino R, Cabezón O, Millán J, Pabón M, Arnal MC, Luco DF, Gortázar C, Dubey JP, Almería S. 2007. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 148:187–192.
- Sobrino R, Dubey JP, Pabón M, Linarez N, Kwok OC, Millán J, Arnal MC, Luco DF, Lopez-Gatius F, Thulliez P, et al. 2008. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 155:190–197.
- Stieve E, Beckmen K, Kania SA, Widner A, Patton S. 2010. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibody prevalence in Alaska wildlife. *J Wildl Dis* 46:348–355.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *Int J Parasitol* 30:1217–1258.

Submitted for publication 9 July 2015.

Accepted 6 October 2015.

Anexo 2

VECTOR-BORNE AND ZOOLOGICAL DISEASES
Volume 17, Number 10, 2017
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/vbz.2016.2105

Seroprevalence of Leptospirosis, Brucellosis, and Q Fever in a Wild Red Deer (*Cervus elaphus*) Population Kept in a Fenced Reserve in Absence of Contact with Livestock

Jose María San-Miguel Ayanz,^{1,*} Francisco Javier García-Peña,^{2,*} Paula García-Lunar,³ Luis Miguel Ortega-Mora,³ María José Ruano,² Gema Álvarez-García,³ and Esther Collantes-Fernández³

Abstract

Wildlife health is of interest for public and animal health because wild animals have been identified as important sentinels for the surveillance for zoonotic pathogens. This work investigated *Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, and *Leptospira* spp. infection seroprevalence in a free-ranging red deer population. The study was conducted in a fenced reserve with controlled hunting activity in central Spain with animals that did not have any contact with livestock. Sampling was performed at two time points before and 5 years after the implementation of new management measures, including a reduction in the red deer population in the reserve. In addition, the presence of *Leptospira* DNA was tested in placental and fetal samples from seropositive pregnant animals. Antibodies against *Brucella* and *Coxiella* were not detected in any sample. The seroprevalence of *Leptospira* was 9.4% (13/137) in the first sampling for serovars Canicola and Panama. Five years later, the prevalence rose to 38.5% (97/252) with Pomona, the only serovar detected. Animals older than 2 years (50%; 70/140) were more likely to be Pomona seropositive than animals ≤2 years old (25.2%; 27/107; $p < 0.001$). *Leptospira* DNA was not detected in any sample tested. In conclusion, wild red deer in this area without contact with livestock seem not to play an important role in *Brucella* spp. and *C. burnetii* maintenance. The high seroprevalence of *Leptospira* spp. serogroup Pomona could indicate a risk for people with narrow contact with these animals, but the carrier status was not assessed. Consequently, it is unknown if red deer would represent a risk for human infection. Considering that wild boar could be the source of infection to red deer, the role of wild boar in the spread of leptospirosis and the risk for human infection should be investigated.

Keywords: *Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Leptospira*, red deer, seroprevalence, zoonosis

Introduction

WILDLIFE HEALTH IS OF INTEREST in terms of conservation and because wild animals are important sentinels for the surveillance for zoonotic pathogens (Rabinowitz et al. 2006, Halliday et al. 2007). In Spain, the red deer (*Cervus elaphus*) has notably increased its population size (Acevedo et al. 2008). This finding is most likely due to the abandonment of fields, the advance of forests, and the implementation of hunting management practices (Acevedo et al. 2005). The current range of the red deer extends

throughout Spain with higher densities in the southwest, where it is one of the most culturally and economically important hunting species (Carranza 2004). Exposure of hunters to wildlife during game carcass dressing has been proposed as a potential zoonotic risk (Bengis et al. 2004). In this context, brucellosis, Q fever, and leptospirosis are important zoonotic bacterial diseases. Brucellosis is caused by bacteria of the genus *Brucella* (Bengis et al. 2004), *Brucella abortus* and *B. melitensis* being the species most regularly transmitted between wild and domestic ungulates (Bengis et al. 2004, Van Campen and Rhyen 2010). Q fever is a zoonosis with a

¹ZOETIS, Madrid, Spain.

²Laboratorio Central de Veterinaria de Algete, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Algete, Spain.

³SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

*These authors contributed equally to this work.

SEROPREVALENCE OF ZONOTIC BACTERIAL INFECTIONS IN RED DEER

693

worldwide distribution that is caused by the Gram-negative intracellular bacterium *Coxiella burnetii* (González-Barrio et al. 2015). A high prevalence of this pathogen in deer and the deer-human contact may represent an important risk factor for human infection, especially in areas where a significant percentage of animals have been exposed to the bacterium (Kirchgesner et al. 2013). Leptospirosis is a worldwide zoonotic infection that occurs in domestic and wild mammals (Bharti et al. 2003) and is considered one of the most important reemerging human health hazards by the OIE (Bengis et al. 2004). Among wildlife species, rodents and wild boars are considered to be important reservoirs for leptospirosis (Bharti et al. 2003). Finally, these diseases are also important causes of reproductive failure in domestic ruminants (Bengis et al. 2004, Gortazar et al. 2007, García-Ispuerto et al. 2014). As a result of this situation, surveillance studies that assess the role that red deer may play in the maintenance of different zoonotic pathogens in Spain could have important contributions to the prevention and control programs. The aim of this work was to determine the seroprevalence of *Brucella* spp., *C. burnetii*, and *Leptospira* spp. infections in a wild red deer population kept in a fenced reserve with controlled hunting activity. The animals did not have any contact with livestock for several decades. The samplings were performed at two different time points before and 5 years after the implementation of several management measures. The influence of different risk factors (age, gender, and pregnancy) was also evaluated. Finally, the presence of *Leptospira* DNA was investigated in placental and fetal collected samples from seropositive pregnant animals.

Materials and Methods

Sampling area

The samplings were performed in the Quintos de Mora reserve, which is a fenced hunting area of 6864 ha located in the province of Toledo (Central Spain) that extends on a plain 800 meters above sea level (m.a.s.l.) and a mountainous area that reaches 1200 m.a.s.l. The climate is Mediterranean with rather cold winters (average temperature of the coldest month between 0°C and 18°C) and hot (average temperature in the hottest month above 22°C) and dry summers (“Csa” following the climate classification of Köppen-Geiger) (Iberian climate Atlas, AEMET). The most representative mammals are the hunting species red deer, wild boar (*Sus scrofa*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*). Livestock has not been present in Quintos de Mora for at least five decades.

Experimental design

The seroprevalence of *Brucella* spp., *C. burnetii*, and *Leptospira* spp. was studied in red deer samples collected in 2007 and 2012 during the hunting season (from January to March). Changes in the management system of the Quintos de Mora reserve were implemented during this 5-year period. The new management system included a reduction in the red deer population, which decreased from 2500 to 1700 animals through controlled selective hunting. The number of roe deer and fallow deer present in “Quintos de Mora” is below 100 animals and the census has not varied over time. In addition, traditional food supplementation done in fixed troughs during the dry season was replaced by opening fenced grazing areas to guarantee enough food supply.

Animals were hunted and blood samples were opportunistically collected from the culled animals. A total of 137 and 252 samples were collected in the first and second samplings, respectively. The number of animals sampled was representative, corresponding to 5.4% (137/2500) and 14.8% (252/1700) of the red deer population from the area, respectively. Blood was collected by heart puncture in plastic tubes and sent to the laboratory at 4°C. In the laboratory, serum samples were collected after centrifugation and stored at -80°C before analysis. *Brucella* spp., *C. burnetii*, and *Leptospira* spp.-specific antibodies were detected using the Rose Bengal Test, ELISA, and Microscope Agglutination Test (MAT), respectively, as described below. The ages of the free-ranging deer were determined using canine morphological and metric variables (D’Errico and Vanhaeren 2002), and the animals were classified into the following age groups: animals ≤2 and >2 years. Gender and pregnancy data were annotated when possible. In pregnant animals, a sample was collected from the placenta and the fetal brain, lung, kidney, and liver tissues, or the whole fetus (depending on the fetus size). All samples were stored at -20°C before analysis.

This study did not involve the purposeful killing of animals. All samples originated from legally hunted dead wildlife.

Rose Bengal Plate agglutination test

To detect antibodies against smooth *Brucella* spp., serum samples were analyzed using the Rose Bengal Test according to the OIE recommendations (OIE 2015).

ELISA

The LSIVet™ Ruminant Q Fever commercial test (LSI, Lissieu, France) was employed for the detection of specific antibodies against *C. burnetii*. The manufacturer’s instructions were followed for the testing and interpretation of results. *C. burnetii* ELISA was validated using 23 positive and 23 negative reference red deer sera from a previous study (González-Barrio et al. 2015), and observed a perfect concordance (Cohen’s kappa coefficient = 1) (data not shown).

Microagglutination test

The test was performed at the “Laboratorio Central de Veterinaria” (Algete, Madrid, Spain), which is the Spanish reference laboratory for leptospirosis, using the following live strains of *Leptospira*: *L. borgpetersenii* serovars Australis, Ballum, Bataviae, Castellonis, Djasiman, Hardjo, Javanica, and Tarassovi; *L. interrogans* serovars Autumnalis, Bratislava, Canicola, Copenhageni, and Pomona; *L. kirschneri* serovars Cynopteri and Grippityphosa; *L. noguchii* serovars Louisiana and Panama; and *L. weilii* serovar Sarmin. All strains were originally supplied by the Veterinary Research Laboratories (Stormont, Belfast, United Kingdom) with the exception of the strains of serovars Castellonis, Djasiman, and Panama, which came from the National Laboratories Services (Ames, IA).

The strains were cultured in a liquid medium with Tween 80/40-bovine serum albumin (Ellis and Thiermann 1986), incubated at 29°C, and used after 4–8 days. The concentration of the antigens used for the test was adjusted to a transmittance of 60–70% measured at a 400 nm wavelength. The sera were initially examined at a 1:30 dilution against each of the 18 serovars. Sera

TABLE 1. RISK FACTORS RELATED TO SEROPOSITIVITY AGAINST *LEPTOSPIRA* spp. IN RED DEER

Factor	Sampling	Category	<i>Leptospira</i> spp. seroprevalence		
			No. positive/ no. tested (%)	95% CI	OR (95% CI); p-value
Age ^a	First sampling	≤2 years	7/54 (12.9)	4.1–21.8	0.61 (0.19–1.93); p=0.58
		>2 years	6/72 (8.3)	2.0–14.6	
	Second sampling	≤2 years	27/107 (25.2)	17.3–33.2	2.96 (1.71–5.12); p=0.0001
		>2 years	70/140 (50)	41.9–57.9	
Sex ^b	First sampling	Male	7/66 (10.6)	3.3–17.9	0.95 (0.3–3.02); p=0.83
		Female	6/61 (9.8)	2.5–17.2	
	Second sampling	Male	36/98 (36.7)	27.4–46.0	1.13 (0.67–1.9); p=0.74
		Female	61/154 (39.6)	32.1–47.0	
Pregnancy status ^c	First sampling	Pregnant	0/5 (0)	0.0–45.0	0.29 (0.01–5.56); p=0.5
		Nonpregnant	6/49 (12.2)	3.2–21.0	
	Second sampling	Pregnant	35/86 (40.7)	30.6–50.8	1.25 (0.63–2.4); p=0.47
		Nonpregnant	22/62 (35.5)	23.7–47.2	

^aAge data were not recorded for 11 and 5 animals in the first and second sampling, respectively.

^bSex data were not recorded for 10 animals in the first and second sampling.

^cPregnancy status data were not recorded for 83 and 104 animals in the first and second sampling, respectively.

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

with some degree of agglutination activity at the 1:30 dilution were retested against each serovar to which they reacted using 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000, and 1:30,000 dilutions. Any serum sample for which approximately ≥50% of the leptospires were agglutinated at a 1:100 dilution was classified as positive. The final titer was the highest dilution of the serum at which ≥50% or more of the leptospires were agglutinated. A reference antiserum (National Veterinary Services Laboratories) and positive and negative controls were included in each assay.

Leptospira real-time polymerase chain reaction

A total of 22 pregnant females with a positive MAT *Leptospira* spp. result were selected in the second sampling. Placental and fetal samples were thawed. Total DNA was extracted separately from the placental and pooled fetal tissues (using the BioSprint 96 DNA Blood + Buffer ATL Kit (Qiagen GmbH, Germany) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed according to the previously published protocol (Stoddard 2013); negative and positive extraction controls were included in each assay.

Data analysis

Apparent prevalence rates according to gender, pregnancy status, and age were organized in contingency tables and the data were analyzed using the chi-squared or Fisher exact test (Table 1). Risk factors were also studied by estimating the odds ratios (OR). Age between samplings was compared by Student's *t*-test. *p* Values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Prevalence and risk factor analysis

All samples were seronegative for *Brucella* spp. and *C. burnetii* in both samplings. The results showed that 9.4% of

the samples (13/137; 95% confidence interval [CI]: 4.7–14.2) had antibodies against *Leptospira* spp. in the first sampling, whereas the apparent prevalence rate 5 years later rose to 38.5% (97/252; 95% CI: 32.9–44.0) (OR=5.9; CI: 3.19–11.16; $\chi^2=35.39$; $p<0.0001$). Most animals had antibodies against only one serovar. During the first sampling, 1.4% (2/137; 95% CI: 0.0–3.4) and 6.5% (9/137; 95% CI: 2.5–10.6) of the samples were only positive for serovars Canicola and Panama, respectively, and only two samples were positive for both serovars. Only serovar Pomona was found during the second sampling.

During the first sampling, no significant differences ($p>0.05$) were observed between age, gender, and pregnancy status (Table 1). However, in the second sampling, animals >2 years old (50%) were more likely to be Pomona seropositive than animals ≤2 years old (25.2%). No significant difference in the mean age was found between samplings ($p>0.05$; Student's *t*-test).

The antibody titers (Table 2) against serovar Canicola detected during the first sampling were 1:100 and 1:1000. In addition, most animals had a 1:100 titer against serovar Panama. Interestingly, the two samples showing coinfections had MAT titers of 1:100 and 1:1000 against serovars Canicola and Panama, respectively. In contrast, most animals had

TABLE 2. DISTRIBUTION OF SPECIFIC ANTIBODY TITERS FOR THE DIFFERENT *LEPTOSPIRA* spp. SEROVARS STUDIED IN WILD RUMINANTS DURING THE TWO SAMPLINGS

Serovar	1:100	1:300	1:1000
Canicola	50% (2/4) ^a	0	50% (2/4) ^a
Panama	90.9% (10/11) ^a	0	9% (1/11) ^a
Pomona	33% (32/97) ^b	46.4% (45/97) ^b	20.6% (20/97) ^b

^aData corresponding to the first sampling (2007).

^bData corresponding to the second sampling (2012).

SEROPREVALENCE OF ZONOTIC BACTERIAL INFECTIONS IN RED DEER

695

antibody titers of 1:300, 1:100, and 1:1000 against serovar Pomona in the second sampling.

Finally, *Leptospira* DNA was not detected in any of the placental and fetal samples from pregnant animals seropositive for *Leptospira* spp.

Discussion

Brucella spp., *C. burnetii*, and *Leptospira* spp. are important worldwide zoonotic pathogens; however, the role wildlife plays in maintaining these diseases outside of their target domestic animal or human populations is uncertain (Godfroid 2002, Arricau-Bouvery and Rodolakis 2005, Kirchgesner et al. 2013). In our study, antibodies against *Brucella* spp. were not detected in the sampled red deer population. This finding suggests that red deer seems not to be a suitable host for smooth *Brucella* species. Our results are in agreement with previous studies performed in red deer and other wild ruminants in different regions of Spain (Boadella et al. 2010, Muñoz et al. 2010, Serrano et al. 2011). Red deer also tested negative for *Brucella* in studies from the Czech Republic (Hubálek et al. 1993) and Central Italian Alps (Gaffuri et al. 2006). The sporadic cases reported in red deer were primarily associated with animals living with infected livestock (Hars et al. 2003). *C. burnetii* antibodies were not detected in our study; therefore, red deer could not play an important role in the sylvatic cycle of *C. burnetii* in this area. Previous Q-fever studies in wildlife in Spain showed a seroprevalence in wild red deer of 9.5% and 0% in the northern and southern areas, respectively (Ruiz-Fons et al. 2008). A seroprevalence of 3.8% in unmanaged red deer was found near the area where our hunting reserve was located (González-Barrio et al. 2015). Other studies performed in wild ruminants in Europe have shown an anti-*C. burnetii* antibody prevalence of 25% in red deer from the Czech Republic (Hubálek et al. 1993). These differences may depend on the living environments and higher contact with domestic ruminants.

The most remarkable results corresponded to the presence of *Leptospira* infections. However, the circulating serovars and the seroprevalence rates varied temporally. The first noticeable finding was a significant increase in the overall prevalence rate in the second sampling that rose from 9.4% to 38.5%. In agreement with the low prevalence rate found in the first sampling, a prevalence of 6.3% deer was reported in the central Italian Alps (Andreoli et al. 2014). In Spain, low seroprevalence rates were found in red deer from the southern (4.6%, Arenas et al. 1991) and northern (2.6%, Espí et al. 2010) areas. Although it is difficult to compare studies due to the different cutoff values employed (usually 1:320), in our study, 27.2% of the samples had titers equal to or higher than 1:300.

Antibodies to serogroups Canicola (1.4%) and Panama (6.5%) were detected in the first sampling. Most of the positive red deer from the first sampling harbored antibodies against serovar Panama, whose origin is probably associated with carnivores and rodents. In France, a prevalence of 18% against this serovar has been reported in European polecat (*Mustela putorius*) (Moinet et al. 2010), this mustelid species is present in “Quintos de Mora” (Arija 2010). In the past, Pomona and Icterohaemorrhagiae were the most prevalent serovars described in red deer from southern Spain (León-

Vizcaíno et al. 1994). In northern Spain, Pomona (1.6%), Bratislava (1.1%), Grippotyphosa (0.7%), Muenchen (2.6%), and Panama (1.2%) were found in red deer (Espí et al. 2010). These differences might be due to ecological and environmental factors that determine the geographic distribution of the maintenance hosts for each serovar. During the second sampling, the overall leptospirosis seroprevalence significantly increased. Only antibodies against the Pomona serogroup were detected, suggesting variability in exposure over time. Variations in prevalence could also reflect variations in the interaction between hosts and higher environmental contamination. Contact with some epidemiologically relevant species could have increased the risk of exposure of red deer to this pathogen. In the case of the Pomona serogroup, the most likely source of infection could be different rodent species and wild boar. *Leptospira kirschneri* serovar Mozdok (serovar belonging to serogroup Pomona) has been isolated from small rodents trapped in the vicinity of “Quintos de Mora” (Arent et al. 2017). Regarding the role of wild boar, it is known that there is an increase of wild boar populations across Europe. Mild winters, reforestation, intensification of crop production, supplementary feeding, and compensatory population responses of wild boar to hunting pressure might explain this population growth (Acevedo et al. 2007). Although the number of wild boars could not be determined in our study, hunting numbers could be used as indicator of animal numbers. In this study, a total of 35 and 211 wild boars were culled during the first and second sampling season, respectively, suggesting a higher number of wild boars. Moreover, in “Quintos de Mora,” the new management system included a reduction in the red deer population and the growth of natural vegetation available for animals during the dry season to guarantee enough food supply. These measures could have influenced the spread of Pomona, increasing aggregation, for example at feeding sites, since red deer and wild boar could share the same feeding areas (open fenced grazing areas) and the habit of walling in water pools in summer. Moreover, adult males mark their territory during the mating season and spread the infection. This contact and behavior most likely favors the transmission of the infection through contaminated pasture, mud, and water (Johnson et al. 2004, Barasona 2015). In addition, Pomona has been also retrieved in cattle and pigs near to “Quintos de Mora” area, being the most likely source of infection in wild boars (Arent et al. 2017). A high Pomona prevalence (38.1%) was detected in a fallow deer population in northern Spain together with high titers in wild boars after 5 years without positive reactors. Simultaneously, high titers (>1:1280) were detected in several European wild boars in the region (Espí et al. 2010). Unfortunately, boar samples were not collected in our study. Because the wild boar population in Spain shows a tendency to grow, we can infer that wild boars may play an important role in leptospirosis transmission. Further studies on leptospirosis and the isolation of the infective agent are indicated in wild boars in this area. Accordingly, integrative management measures should be designed according to the wildlife populations present in the habitat (e.g., reduction of the current wild boar population).

When the risk factors associated with Pomona infection were studied, red deer older than 2 years showed a significantly higher seropositivity rate than young animals in the second sampling. This result was in agreement with other

studies in domestic (Barwick et al. 1997, Ward et al. 2002, Balakrishnan et al. 2011) and wild animals (Vale-Gonçalves et al. 2015) because the possibility of contact with *Leptospira* increases over the animal lifespan. In our study, *Leptospira* DNA was not detected in placental and fetal tissues from seropositive pregnant animals. The most plausible explanation is that the pathogen was not located in these tissues or the antibody titers are due to past exposure to strains of the Pomona serogroup. Then, the infection was eliminated in a short period of time because red deer are probably an accidental host for serogroup Pomona (Ayanegui-Alcerreca et al. 2007). However, the lack of *Leptospira* DNA detection could be also due to the low pathogen numbers in placental and fetal tissues, which made it undetectable by the technique employed. Connections between red deer hind abortions and leptospirosis infections need to be clarified in the future.

Conclusions

In conclusion, free wild red deer without contact with domestic animals seem not to play an important role in *Brucella* spp. and *C. burnetii* maintenance in the studied area. A high seroprevalence of *Leptospira* spp. serogroup Pomona was detected, but the carrier status was not assessed in this study. Consequently, it is unknown if red deer would represent a risk for human infection. On the other hand, considering that wild boar could be the source of infection to red deer, the role of wild boar in the spread of leptospirosis and the risk for human infection should be investigated.

Acknowledgments

This study was financed by the SALUVET research group's own resources. Authors thank Consejería de Agricultura, Medio Ambiente y Desarrollo Rural de Castilla la Mancha, for the institutional authorization to collect the samples. Authors also thank Daniel Gutierrez-Expósito (Saluvet group), Jose María Blasco, Agustín Gutiérrez-Sierra, Carlos Rodríguez-Vigal, Angel Moreno Gómez, and staff of Quintos de Mora for their collaboration in the samplings.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

Acevedo P, Delibes-Mateos M, Escudero MA, Vicente J, et al. Environmental constraints in the colonization sequence of roe deer (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) across the Iberian Mountains, Spain. *J Biogeogr* 2005; 32:1671–1680.

Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J, Reyes-García AR, et al. Estimating red deer abundance in a wide range of management situations in Mediterranean habitats. *J Zool* 2008; 276: 37–47.

Acevedo P, Vicente J, Höfle U, Cassinello J, et al. Estimation of European wild boar relative abundance and aggregation: A novel method in epidemiological risk assessment. *Epidemiol Infect* 2007; 135:519–527.

Andreoli E, Radaelli E, Bertolotti I, Bianchi A, et al. *Leptospira* spp. infection in wild ruminants: A survey in Central Italian Alps. *Vet Ital* 2014; 50:285–291.

Arenas A, Perea A, Espejo J, Molera M, et al. Serological survey of some interesting bacterial agents in feral red deer

(*Cervus elaphus*) from west “Sierra Morena” (Spain). *Verhber. Erkr. Zoo-Wildt, Rabat (Morocco)*. Akademie-Verlag Berlin 1991; 33:241–244.

Arent ZJ, Gilmore C, San-Miguel Ayanz JM, Neyra LQ, et al. Molecular epidemiology of *Leptospira* serogroup Pomona infections among wild and domestic animals in Spain. *Eco-health* 2017; 14:48–57.

Arija C M. Turón-*Mustela putorius*. In: Salvador, A., Cassinello, J. eds. *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales, 2010.

Arricau-Bouvery N, Rodolakis, A. Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res* 2005; 36:327–349.

Ayanegui-Alcerreca MA, Wilson PR, Mackintosh CG, Collins-Emerson JM, et al. Leptospirosis in farmed deer in New Zealand: A review. *N Z Vet J* 2007; 55:102–108.

Balakrishnan G, Parimal R, Govindarajan R, Ramaswamy V, et al. Seroepidemiological studies on Leptospirosis among bovines in an organized farm. *IJAVMS* 2011; 5:511–519.

Barasona JA. Epidemiología y prevención en la interacción sanitaria entre ungulados domésticos y silvestres. Dissertation, IREC- University of Castilla—La Mancha, Ciudad Real, Spain, 2015.

Barwick RS, Mohammed HO, McDonough PL, White ME. Risk factors associated with the likelihood of leptospiral seropositivity in horses in the state of New York. *Am J Vet Res* 1997; 58:1097–1103.

Bengis RG, Leighton FA, Fischer JR, Artois M, et al. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev Sci Tech* 2004; 23:497–511.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:757–771.

Boadella M, Carta T, Oleaga A, Pajares G, et al. Serosurvey for selected pathogens in Iberian roe deer. *BMC Vet Res* 2010; 6:51.

Carranza J. Ciervo—*Cervus elaphus*. In: Carrascal LM, Salvador A, eds. *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales, 2004.

D’Errico F, Vanhaeren M. Criteria for identifying red deer (*Cervus elaphus*) age and sex from their canines. Application to the Study of Upper Palaeolithic and Mesolithic Ornaments. *J Archaeol Sci* 2002; 29:211–232.

Ellis WA, Thiermann AB. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava from swine in Iowa. *Am J Vet Res* 1986; 47:1458–1460.

Espí A, Prieto JM, Alzaga V. Leptospiral antibodies in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), fallow deer (*Dama dama*) and European wild boar (*Sus scrofa*) in Asturias, Northern Spain. *Vet J* 2010; 183:226–227.

Gaffuri A, Giacometti M, Tranquillo VM, Magnino S, et al. Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian Alps. *J Wildl Dis* 2006; 42:685–690.

García-Ispuerto I, Tutusaus J, López-Gatius F. Does *Coxiella burnetii* affect reproduction in cattle? A clinical update. *Reprod Domest Anim* 2014; 49:529–535.

Godfrind J. Brucellosis is wildlife. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2002; 21:277–286.

González-Barrio D, Velasco AL, Boadella M, Beltrán-Beck B, et al. Host and environmental factors modulate the exposure of free-ranging and farmed red-deer (*Cervus elaphus*) to *Coxiella burnetii*. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81:6223–6231.

SEROPREVALENCE OF ZONOTIC BACTERIAL INFECTIONS IN RED DEER

697

- Gortazar C, Ferroglio E, Höfle U, Frölich K, et al. Diseases shared between wildlife and livestock: A European perspective. *Eur J Wildl Res* 2007; 53:241–256.
- Halliday JE, Meredith AL, Knobel DL, Shaw DJ, et al. A framework for evaluating animals as sentinels for infectious disease surveillance. *J R Soc Interface* 2007; 4:973–984.
- Hars J, Game Y, Le Tallec Y, Gauthier D. Surveillance de la brucellose du chamois (*Rupicapra rupicapra*) en Savoie: Historique et données récentes. *Bull Inf Pathol Anim Sauv* 2003; 26:168–169.
- Hubálek Z, Juricová Z, Svobodová S, Halouzka J. A serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic. *J Wildl Dis* 1993; 29:604–607.
- Iberian Climate Atlas. 2011. AEMET: www.aemet.es/documentos/es/conocermas/publicaciones/Atlas-climatologico/Atlas.pdf
- Johnson M, Smith H, Joseph P, Gilman R, et al. Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerg Infect Diseases* 2004; 10:1016–1022.
- Kirchgeßner MS, Dubovi EJ, Whipps CM. Disease risk surface for *Coxiella burnetii* seroprevalence in white-tailed deer. *Zoonoses Public Health* 2013; 60:457–460.
- León-Vizcaíno L, Cubero-Pablo MJ, Astorga-Márquez R, Oliver-Hernández P, et al. Encuesta inmunológica en ciervos en Andalucía. XIX Jornadas Científicas de la S.E.O.C., Burgos (Spain). Consejería de Agricultura. Junta de Castilla-León 1994; 323–331.
- Moinet M, Fournier-Chambrillon C, André-Fontaine G, Aulagnier S, et al. Leptospirosis in free-ranging endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores (Mustelidae, Viverridae) from southwestern France. *J Wildl Dis* 2010;46:1141–1151.
- Muñoz PM, Boadella M, Arnal M, de Miguel MJ, et al. Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. *BMC Infect Dis* 2010; 10:46.
- OIE. 2015. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. www.oie.int Accessed December, 2016.
- Rabinowitz P, Gordon Z, Chudnov D, Wilcox M, et al. Animals as sentinels of bioterrorism agents. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:647–652.
- Ruiz-Fons F, Rodríguez O, Torina A, Naranjo V, et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. *Vet Microbiol* 2008; 126:282–286.
- Serrano E, Cross PC, Beneria M, Ficapal A, et al. Decreasing prevalence of brucellosis in red deer through efforts to control disease in livestock. *Epidemiol Infect* 2011; 139:1626–1630.
- Stoddard RA. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *Methods Mol Biol* 2013; 943:257–266.
- Vale-Gonçalves HM, Cabral JA, Faria MC, Nunes-Pereira M, et al. Prevalence of *Leptospira* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) from Northern Portugal: Risk factor analysis. *Epidemiol Infect* 2015; 18:1–5.
- Van Campen H, Rhyen J. The role of wildlife in diseases of cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010; 26: 147–161.
- Ward P, Glickman T, Guptill E. Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970–1998). *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220: 53–58.

Address correspondence to:
 Esther Collantes Fernández
 SALUVET, Animal Health Department
 Faculty of Veterinary Sciences
 Complutense University of Madrid
 Ciudad Universitaria s/n
 28040 Madrid
 Spain

E-mail: esthercf@ucm.es